

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

# **Charakterisierung des Liganden des antiviralen Rezeptors Retinoic Acid-Inducible Gene I**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Hamm

aus Weilheim i. OB

2012



---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann  
Prof. Dr. Gunnar Schotta  
Prof. Dr. Ludger Klein

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß  
Dr. rer. nat. Andreas Schmidt

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2012



---

Meinen Eltern in Dankbarkeit



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Immunsystem des Menschen .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität.....	1
1.1.2 <i>Pattern Recognition</i> -Rezeptoren: Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität .....	2
1.1.3 RIG-I-ähnliche Helikasen als intrazelluläre <i>Pattern Recognition</i> -Rezeptoren.....	3
1.1.3.1 RIG-I.....	4
1.1.3.2 MDA5 .....	5
1.1.3.3 LGP2 .....	6
<b>1.2 Typ I Interferon: Effektor der angeborenen Immunität.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Viren als intrazelluläre "Parasiten" .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Erkennung viraler Nukleinsäuren durch das angeborene Immunsystem.....	9
<b>1.4 Fragestellung .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Geräte, Verbrauchsmittel und Reagenzien.....	12
2.1.1.1 Geräte .....	12
2.1.1.2 Reagenziensätze.....	12
2.1.1.3 Chemikalien .....	13
2.1.1.4 Materialien für die Zellkultur .....	15
2.1.1.5 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen .....	15
2.1.2 Zellen, Nukleotide und Proteine.....	16
2.1.2.1 Zelllinien .....	16
2.1.2.2 Sequenzen von RNA-Oligonukleotiden und <i>Small-interfering</i> -RNAs .....	16
2.1.2.3 DNA-Primer und –Templates .....	17
2.1.2.4 Plasmide .....	18
2.1.2.5 Proteinkonstrukte .....	18
2.1.2.6 Antikörper.....	18
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.2.1 Zellulär-immunologische Methoden .....	18
2.2.1.1 Zellkultur.....	18
2.2.1.2 Aufreinigung von Zellpopulationen.....	19
2.2.1.3 Transfektion und Stimulation von Zellen .....	20
2.2.1.4 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> zur Quantifizierung von IFN- $\alpha$ und IP-10 21	

2.2.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und <i>Western Blot</i> .....	22
2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	23
2.2.2.1 <i>In vitro</i> -Transkription .....	23
2.2.2.2 RNA-Auftrennung mittels denaturierender Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	25
2.2.2.3 RNA-Isolation aus Polyacrylamidgelen.....	26
2.2.2.4 Sequenzierung von cDNA der <i>in vitro</i> transkribierten RNA.....	26
2.2.2.5 Luciferase Assay .....	26
2.2.2.6 ADP-Assay .....	27
2.2.2.7 Größenausschluss-Chromatographie .....	28
2.2.2.8 Fluoreszenz-Anisotropie-Assay .....	29
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Einfluss der 5'-Modifikation von RNAs auf die Induktion einer Immunantwort sowie die Aktivierung der ATPase-Aktivität von RIG-I ..</b>	<b>30</b>
3.1.1 Induktion der Interferonproduktion in humanen Blut-Monozyten ist abhängig von der 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA .....	30
3.1.2 Auslösung der Immunantwort durch Triphosphat-RNA ist abhängig von RIG-I.....	31
3.1.3 Doppelsträngigkeit oder 5'-Triphosphatmodifikation von RNAs führen zur Induktion der ATPase-Aktivität von RIG-I .....	33
3.1.4 Abspaltung des 5'-Triphosphates führt zur Reduktion der Interferonproduktion in humanen Blut-Monozyten.....	34
3.1.5 Induktion der ATPase-Aktivität von RIG-I mittels <i>in vitro</i> transkribierter RNA ist unabhängig von der 5'-Triphosphatmodifikation.....	35
<b>3.2 <i>In vitro</i> transkribierte RNA enthält unerwartete Produkte .....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Analyse der IVT-Produkte mittels denaturierender Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	36
3.2.2 Unerwartete längere IVT-Produkte sind für die Induktion der Interferonproduktion verantwortlich .....	37
3.2.3 Unerwartete IVT-Produkte induzieren die ATPase-Aktivität von RIG-I .....	38
<b>3.3 Unerwartete IVT-Produkte enthalten Haarnadel-RNA-Strukturen, die in der Lage sind, RIG-I zu aktivieren .....</b>	<b>39</b>
3.3.1 Sequenzierung der unerwarteten IVT-Produkte liefert Haarnadel-RNA-Strukturen ...	40
3.3.2 <i>In vitro</i> transkribierte Haarnadel-RNAs enthalten keine Nebenprodukte und induzieren die Interferonproduktion in humanen Blut-Monozyten .....	41
3.3.3 Immunstimulatorische Eigenschaft der Haarnadel-RNAs ist abhängig von RIG-I.....	43
<b>3.4 Doppelsträngigkeit neben 5'-Triphosphatmodifikation als weitere Voraussetzung für die Auslösung einer Interferonantwort via RIG-I.....</b>	<b>44</b>



---

3.4.1 5'-Triphosphatmodifikation alleine ist nicht ausreichend für die Aktivierung von RIG-I .....	44
3.4.2 Doppelsträngigkeit der RNA ist ausreichendes Kriterium für die Induktion der ATPase-Aktivität von RIG-I .....	45
3.4.3 Durch synthetische Triphosphat-RNA ausgelöste Immunantwort ist abhängig von RIG-I .....	46
3.4.4 Einfluss der Länge der Doppelsträngigkeit auf Interferonproduktion und ATPase-Aktivität .....	47
3.4.4.1 Minimale Doppelsträngigkeit für die Aktivierung der Interferonproduktion ist abhängig von der Entfernung zur 5'-Triphosphat-Modifikation .....	47
3.4.4.2 Aktivierung der ATPase-Aktivität von RIG-I korreliert mit der Länge der Doppelsträngigkeit unabhängig von der 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA .....	48
<b>3.5 Sowohl die 5'-Triphosphat-Modifikation, als auch die Doppelsträngigkeit von RNA tragen zur Homodimerisierung von RIG-I bei.....</b>	<b>50</b>
<b>3.6 Bindung von doppelsträngiger 5'-Triphosphat-RNA an RIG-I erfolgt über unterschiedliche Bindungsstellen .....</b>	<b>51</b>
<b>3.7 Virale <i>Leader</i>-RNAs besitzen beide Erkennungsmerkmale, die zur Aktivierung von RIG-I führen .....</b>	<b>53</b>
3.7.1 Sendai-Virus- <i>Leader</i> -RNA führt zur RIG-I vermittelten Interferonproduktion .....	54
3.7.2 Sendai-Virus- <i>Leader</i> -RNA aktiviert die ATPase-Aktivität von RIG-I .....	54
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Übersicht über die experimentellen Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur.....</b>	<b>60</b>
4.2.1 Die Eigenschaften des RIG-I-Liganden .....	60
4.2.2 Von Liganden-Bindung zur Signaltransduktion – Einfluss der verschiedenen Proteindomänen auf die RIG-I-Aktivierung.....	65
4.2.3 Physiologische RIG-I-Liganden .....	67
<b>4.3 Klinischer Einsatz von RIG-I-Liganden .....</b>	<b>68</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>7. Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>79</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>82</b>

---

<b>9. Veröffentlichungen .....</b>	<b>83</b>
------------------------------------	-----------

<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>84</b>
-----------------------------	-----------

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem des Menschen

Krankheitserreger wie Bakterien, Viren oder Pilze stellen eine ständige Bedrohung für den Menschen dar. Durch ihr Eindringen in Organe und Zellen können sie zu Gewebeschäden führen und somit die Funktionalität und Existenz ihres Wirtes gefährden. Das Immunsystem, welches aus einem komplexen Netzwerk unterschiedlicher Zelltypen und Moleküle besteht, dient der Abwehr von Pathogenen, aber auch der Beseitigung krankhaft entarteter eigener Körperzellen.

Für das Funktionieren des Immunsystems sind zwei Mechanismen entscheidend: In einem ersten Schritt muss der Körper krankheitsauslösende Strukturen erkennen, um anschließend in einem zweiten Schritt mit einer adäquaten Antwort darauf reagieren zu können. Für das Erkennen von fremden Molekülen und Erregern ist es essenziell, körpereigene gesunde Strukturen von fremden bzw. pathologisch veränderten eigenen Strukturen unterscheiden zu können. Dabei spielen molekulare Muster und chemische Modifikationen von Pathogenbestandteilen eine wesentliche Rolle. Das Erkennen eines mikrobiellen Musters führt zur Auslösung einer Immunantwort, was zur Bekämpfung und Beseitigung der auslösenden Mikroorganismen führt und andere Immunzellen in eine erhöhte „Alarmbereitschaft“ versetzt (Delves and Roitt, 2000).

### 1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Die erste Verteidigungslinie gegen Mikroorganismen stellen mechanische und physiologische Barrieren, wie die Haut, dar. Sie verhindert, dass Krankheitserreger in den Körper eindringen. Doch auch auf enzymatischer Ebene werden Pathogene bereits bekämpft, bevor sie im Körper Schaden anrichten können. So enthalten beispielsweise Körperflüssigkeiten wie der Speichel oder die Tränenflüssigkeit das Enzym Lysozym, welches Bestandteile der Zellwand von Prokaryonten spalten kann.

Haben Erreger diese erste Hürde jedoch überwunden, stellen Makrophagen, natürliche Killerzellen und neutrophile Granulozyten als Vertreter der angeborenen Immunität eine weitere Abwehrlinie dar. Wie Epithelzellen sind diese in der Lage, Mikroorganismen mittels Keimbahn-kodierter Rezeptoren zu erkennen und von körpereigenen Zellen und Proteinen zu unterscheiden. Nach dem Erkennen fremder Substanzen folgt die

Produktion und Sezernierung von Botenstoffen, wie den Interleukinen, die dem Organismus Gefahr signalisieren, die Immunantwort in einer bestimmten Körperregion verstärken und weitere Immunzellen rekrutieren können. Äußerlich sichtbare Erscheinungen sind Entzündungsreaktionen und Fieber.

Das adaptive Immunsystem entwickelte sich im Laufe der Phylogenese der Wirbeltiere und kommt erst mit einer Latenz von drei bis fünf Tagen zum tragen. Es hat jedoch den Vorteil, dass die Immunantwort spezifischer, d.h. gegen das jeweilige Antigen gerichtet, erfolgt und somit wesentlich effektiver ist. Weiterhin beinhaltet es eine „Gedächtnisfunktion“, wodurch bei erneutem Befall durch den gleichen oder einen ähnlichen Erreger von Anfang an eine zielgerichtete Abwehrreaktion erfolgen kann. Hauptvertreter der adaptiven Immunität sind die B- und T-Lymphozyten. Dabei sind die B-Lymphozyten unter anderem für die Produktion und Sezernierung von Antikörpern verantwortlich, welche gegen spezifische Oberflächenmoleküle von Mikroorganismen gerichtet sind und diese somit neutralisieren oder für andere Immunzellen „markieren“. T-Lymphozyten hingegen sind einerseits für die zellvermittelte Immunreaktion verantwortlich, andererseits unterstützen sie aber auch die B-Lymphozyten in ihrer Aktivität und regulieren die Immunantwort.

Es ist jedoch nicht sinnvoll, angeborene und adaptive Immunität isoliert voneinander zu betrachten. Vielmehr sind sie eng miteinander vernetzt und ein effektiver Schutz des Organismus erfolgt nur durch eine koordinierte Interaktion beider Systeme.

### **1.1.2 *Pattern Recognition*-Rezeptoren: Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität**

Bei den bereits oben erwähnten Keimbahn-kodierten Rezeptoren handelt es sich um Proteine, welche von diversen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems gebildet werden. Diese können sich entweder frei löslich im Blut befinden, membrangebunden an der Oberfläche bzw. in Endosomen von bestimmten Immunzellen vorkommen oder im Zytosol lokalisiert sein. Aufgrund der Tatsache, dass sie spezifische molekulare Muster von Pathogenen, so genannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen, werden sie als *Pattern Recognition*-Rezeptoren (PRR) bezeichnet. Das Binden eines PAMPs an seinen entsprechenden PRR kann je nach Rezeptor zu Endozytose und nachfolgendem Abbau durch Phagozyten führen und/oder löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, welche letztlich zu einer Aktivierung der Immunzelle und der Sezernierung bestimmter Signalstoffe führt.

Ein Vertreter der im Blut gelösten PRR ist das Mannose-bindende Lektin. Dieses erkennt Kohlenhydrat-Muster an der Oberfläche von Mikroorganismen und führt zu einer Auslösung der Komplementkaskade, welche die Eliminierung der Erreger bewirkt (Fraser et al., 1998). Zu den membrangebundenen Rezeptoren zählen die *Scavenger*-Rezeptoren, welche Phagozyten die Ingestion von Pathogenen ermöglichen. Auch die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) liegen membrangebunden vor, entweder in der Zellmembran oder in Endosomen. Sie sind für die Erkennung verschiedenster Bestandteile von Viren, Bakterien, Pilzen oder Protozoen verantwortlich (Akira et al., 2006).

Haben die Erreger bereits die Zellmembran überwunden, kann durch im Zytosol lokalisierte Rezeptoren eine Immunantwort ausgelöst werden. Neben den *NOD-like*-Rezeptoren (NLRs), welche bakterielle Bestandteile erkennen, und der Protein-Kinase R (PKR), welche doppelsträngige RNA erkennt, befinden sich auch die RIG-I-ähnlichen Helikasen im Zytosol (Takeuchi and Akira, 2010).

### **1.1.3 RIG-I-ähnliche Helikasen als intrazelluläre *Pattern Recognition*-Rezeptoren**

Viele Zellen des menschlichen Körpers sind in der Lage, nach Virusbefall mit einer antiviralen Antwort des angeborenen Immunsystems zu reagieren. Im Gegensatz zu den membrangebundenen *Toll-like*-Rezeptoren, welche nur auf bestimmten Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel dendritischen Zellen und Makrophagen, vorkommen, befinden sich die RIG-I-ähnlichen Rezeptoren im Zytosol der meisten kernhaltigen Zellen des Menschen.

Zur Familie der RIG-I-ähnlichen Helikasen gehören drei Vertreter:

- (1) *Retinoic acid-inducible gene 1*, RIG-I
- (2) *Melanoma differentiation-associated gene 5*, MDA5
- (3) *Laboratory of genetics and physiology 2*, LGP2

Mittels unterschiedlicher Domänen können diese Rezeptoren diverse Muster viraler Nukleinsäuren erkennen und über komplexe Signalkaskaden und Interaktionen mit weiteren Proteinen die Transkription bestimmter Gene auslösen, welche für antivirale Zytokine, insbesondere Typ-1 Interferon (IFN), kodieren.

### 1.1.3.1 RIG-I

*Retinoic acid-inducible gene-1* (RIG-I, auch bekannt unter DDX58) ist ein ubiquitär exprimierter zytosolischer Sensor, der bestimmte Muster viraler Ribonukleinsäuren erkennen kann. Ursprünglich wurde RIG-I als Gen identifiziert, welches in akuten promyelozytischen Leukämiezellen nach Therapie mit Retinolsäure induziert wurde (Barral et al., 2009). Erst einige Jahre später erkannte man seine Rolle als antiviraler Rezeptor. Nach dem Screening einer Expressions-cDNA-Library in Interferon- $\beta$ -behandelten Zellen, konnte RIG-I als Rezeptor für lange doppelsträngige RNA isoliert werden, welcher zu einer Aktivierung des Interferonpromoters führt (Yoneyama et al., 2004).

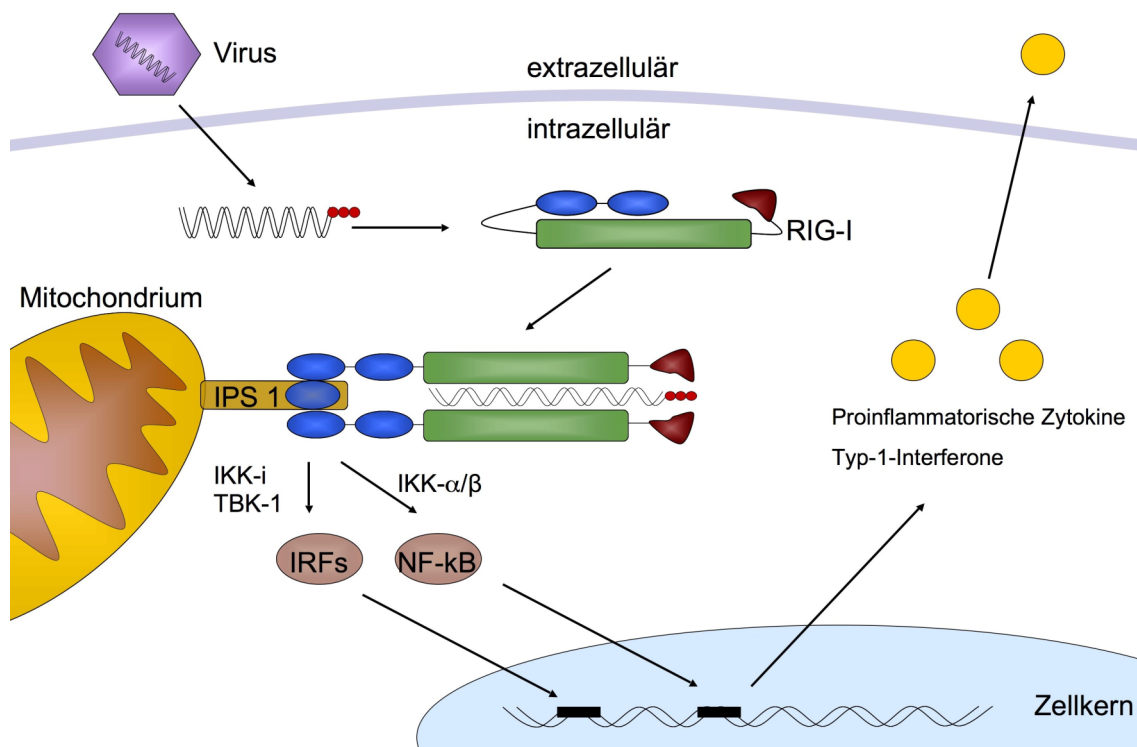
RIG-I ist eine aus 925 Aminosäuren bestehende DEAD-Helikase, welche durch ein konserviertes Motiv von Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat (DEAD) gekennzeichnet ist. Durch Analyse der Primärstruktur konnte zudem vorhergesagt werden, dass es sich um eine Liganden-abhängige ATPase handelt (Cui et al., 2008; Gee et al., 2008; Takahashi et al., 2008). Weiterhin konnte mittels Punktmutation in der Walker-ATP-Bindestelle (K270A) gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität essentiell für die Signalweiterleitung nach Ligandenbindung ist (Yoneyama et al., 2004).

Am N-Terminus von RIG-I befinden sich zwei *Caspase recruitment*-Domänen (CARDs), welche als Effektordomänen mit einem an der Mitochondrienmembran lokalisierten Protein, *CARD adaptor inducing interferon-beta* (Cardif, auch bekannt als MAVS, IPS-1 oder VISA), interagieren und somit nach Erkennung viraler RNA die Weiterleitung des Signals vermitteln (Dixit et al., 2010; Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Bei Überexpression der CARD-Domänen erfolgt eine konstitutive Signaltransduktion, die unabhängig von der Anwesenheit viraler RNA bzw. RIG-I-Liganden ist (Yoneyama et al., 2004). In Abwesenheit viraler RNA supprimieren die CARD-Domänen in der Vollängenversion von RIG-I die ATPase-Aktivität und verhindern eine Aktivierung und somit das Auslösen einer Interferonantwort (Gee et al., 2008).

C-terminal befindet sich eine Repressor-Domäne (RD), welche mit den CARD- und Helikase-Domänen interagieren kann. Die Überexpression der isolierten Repressor-Domäne führt zur Blockade der RIG-I-vermittelten Signaltransduktion (Saito et al., 2007). Erst kürzlich wurde eine C-terminale Domäne (CTD) beschrieben, welche teilweise mit der bereits erwähnten Repressor-Domäne übereinstimmt. Durch Röntgenkristallographie bzw. Magnetresonanzbildgebung konnte die Struktur bestimmt

werden (Cui et al., 2008; Takahasi et al., 2008), welche aus einer konkaven Oberfläche mit gegenüberliegenden sauren Aminosäureresten besteht. Eine positiv geladene Tasche wurde als Bindestelle für doppelsträngige RNA und 5'-Triphosphat-RNA entschlüsselt, ein Zink-Molekül wurde als essentielles Strukturmerkmal für die Funktion der RD identifiziert.

Es wird vermutet, dass das Binden eines Liganden an RIG-I zu einer Konformationsänderung und Dimerisierung von RIG-I-Molekülen führt (Cui et al., 2008). Die ansonsten „maskierten“ CARD-Domänen werden dadurch exponiert und eine Interaktion mit dem Adapterprotein Cardif erfolgt. Die komplexe Signalkaskade, die weitere Adapterproteine und Proteinkinasen enthält, führt schließlich zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), IRF3 und IRF7 (*interferon regulatory factor*), was letztlich zur Produktion und Sekretion von Typ-1-Interferonen führt. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Übersicht über den RIG-I-Signalweg.



**Abb. 1.1** Schematische Darstellung des Signalwegs von RIG-I (modifiziert nach Takeuchi and Akira, 2010)

#### 1.1.3.2 MDA5

*Melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5, auch bekannt unter Helicard oder IFIH1) wurde mittels eines *differentiation induction subtraction hybridization* (DISH)-Screen identifiziert (Huang et al., 1999), welcher dazu diente, Gene zu finden, die bei

der Induktion der terminalen Differenzierung humaner HO-1 Melanomzellen involviert sind.

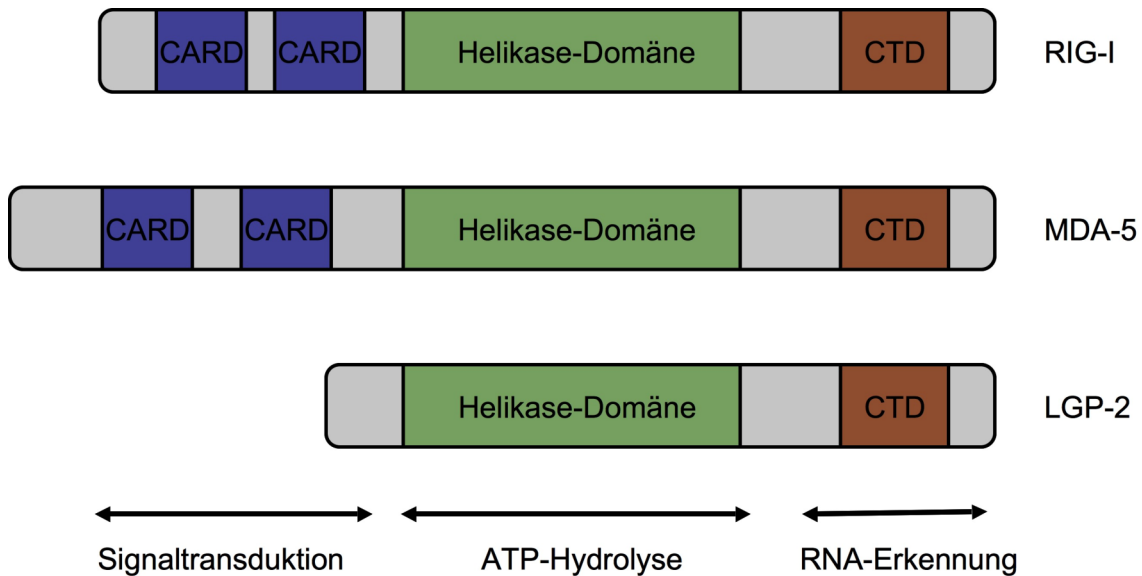
Wie RIG-I ist auch MDA5 eine RNA-Helikase, die als zytosolischer Sensor viraler Nukleinsäuren fungiert. N-terminal besitzt MDA5 ebenso zwei *Caspase recruitment*-Domänen, welche zu etwa 25 Prozent mit denen von RIG-I übereinstimmen und für die Signaltransduktion via Cardif notwendig sind. Die Helikase-Domäne weist eine Homologie von etwa 40 Prozent mit der von RIG-I auf (Takeuchi and Akira, 2008; Yoneyama et al., 2008). Eine Zink-Bindestelle in der C-terminalen Region ist ebenfalls vorhanden. Allerdings ist über den natürlichen Liganden, der zu einer Aktivierung von MDA5 führt, sehr wenig bekannt. Als synthetisches Analogon doppelsträngiger RNA wird derzeit als MDA5-Ligand Polyinosin-Polycytidin-Säure (Poly-I:C) verwendet.

#### 1.1.3.3 LGP2

*Laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) ist das dritte Mitglied der Familie der RIG-I-ähnlichen Helikasen. LGP2 wurde erstmals von Rothenfusser et. al 2005 beschrieben (Rothenfusser et al., 2005). Es enthält ebenfalls eine RNA-Helikase-Domäne, welche größtenteils mit der von RIG-I übereinstimmt (Yoneyama et al., 2004). Im Gegensatz zu RIG-I und MDA5 fehlen jedoch die N-terminalen CARD-Domänen. Durch Überexpression von LGP2 konnte gezeigt werden, dass LGP2 zu einer Inhibierung der durch Sendai-Virus und Newcastle disease-Virus ausgelösten Signaltransduktion über die IRF- und NF- $\kappa$ B-abhängigen Signalwege führt (Rothenfusser et al., 2005).

Die Fähigkeit, ähnlich wie RIG-I, doppelsträngige RNA zu binden sowie das Fehlen der CARD-Effektordomänen, welche für die Interaktion mit dem Adapterprotein Cardif verantwortlich sind, bestärkte die Vermutung, dass LGP2 als negativer Feedback-Regulator einer RIG-I-vermittelten Immunantwort agiert (Rothenfusser et al., 2005; Yoneyama et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass die C-terminal lokalisierte Regulatorische-Domäne (RD) von LGP2 mit RIG-I um doppelsträngige RNA kompetiert (Li et al., 2009; Pippig et al., 2009). Eine neuere Studie zeigte hingegen, dass LGP2 und dessen ATPase-Aktivität sowohl für die effektive Auslösung einer Immunantwort via MDA5, als auch via RIG-I notwendig sein kann (Satoh et al., 2010). Daher wird aktuell davon ausgegangen, dass LGP2 sowohl inhibierend, als auch synergistisch die Funktion von RIG-I und MDA5 moduliert.





**Abb. 2** Schematische Darstellung von RIG-I, MDA5 und LGP2

## 1.2 Typ I Interferon: Effektor der angeborenen Immunität

Issaacs und Lindenmann beschrieben 1957 ein Protein, welches in lebenden Zellen nach Stimulation mit Hitze-inaktivierten Influenzaviren induziert wurde (Issaacs et al., 1957). Da nach Zugabe des Proteins zu virusinfizierten Zellen dieses mit der viralen Replikation interferierte, wurde es als Interferon (IFN) bezeichnet. Mittlerweile sind eine Reihe weiterer Interferon-Subtypen entdeckt worden, so dass man heute von einer Protein-Familie spricht. Interferone können in Typ I, Typ II und Typ III IFN unterteilt werden. Diese werden von unterschiedlichen Zellen produziert und binden an verschiedene Rezeptoren (Farrar and Schreiber, 1993; Pestka, 2000). IFN- $\gamma$  ist der einzige Vertreter des Typ II IFN und wird hauptsächlich nach Antigen- oder Zytokinstimulation von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen gebildet. Die kürzlich entdeckten Typ III Interferone (IFN- $\lambda$ 1 bis 3) ähneln dem Typ I IFN (Vilcek, 2003).

Die Familie des Typ I IFN setzt sich aus mindestens 13 verschiedenen IFN- $\alpha$ -Subtypen, einem IFN- $\beta$  sowie weiteren Interferonen (IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  und IFN- $\omega$ ) zusammen. Da diese überwiegend im Rahmen viraler Infektionen gebildet werden und virale Resistenz in Zielzellen bewirken, wird diese Proteinklasse hauptsächlich als antivirale Klasse angesehen. Typ I Interferone, welche innerhalb kürzester Zeit als Reaktion auf mikrobielle Stimuli sezerniert werden, führen zu einer Aktivierung diverser Effektorzellen sowohl des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems. Dabei inhibiert Typ I IFN unter anderem direkt eine Virusreplikation in infizierten Zellen (Issaacs et al., 1957), steigert die Zytotoxizität von Makrophagen und NK-Zellen (Ortaldo

et al., 1983), fördert die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen durch die Induktion von IL-15 (Zhang et al., 1998), erhält aktivierte T-Zellen am Leben (Marrack et al., 1999) und begünstigt die Antikörperproduktion durch B-Zellen (Le Bon and Tough, 2002). Des Weiteren ist Typ I IFN unabdingbar in der Induktion einer effektiven spezifischen antiviralen Immunität (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Le Bon and Tough, 2002; Muller et al., 1994; Theofilopoulos et al., 2005), spielt jedoch auch in der Immunantwort gegen Bakterien und Protozoen eine entscheidende Rolle (Bogdan, 2000).

### 1.3 Viren als intrazelluläre „Parasiten“

Viren sind obligat intrazelluläre „Parasiten“, welche für ihre Replikation auf Wirtszellen angewiesen sind. Sie befallen sämtliche Organismen von Tieren, Pflanzen, Bakterien bis hin zu Archäen (Koonin et al., 2006). Viren verfügen über keinen eigenen Stoffwechsel, da sie weder Zytoplasma, noch Ribosomen oder Mitochondrien besitzen. Für die Umsetzung ihres „Programms“ zur Vermehrung und Ausbreitung machen sie sich die Maschinerie ihres Wirtes zu Nutze. Seit der Beschreibung des Tabakmosaikvirus durch Martinus Beijerinck 1898 wurden mehr als 5000 verschiedene Virustypen charakterisiert (Bos, 1999). Die meisten Viren befallen jedoch Bakterien. Die Gesamtzahl der Viren weltweit wird auf  $10^{31}$  geschätzt (Breitbart and Rohwer, 2005).

Viren bestehen hauptsächlich aus zwei Bestandteilen: Alle Viren enthalten Gene in Form von DNA oder RNA, die für Proteine kodieren, welche für die Vermehrung und Verbreitung der Viren notwendig sind. Um das virale Genom zu schützen, ist es von einer Proteinhülle umgeben, welche als Kapsid bezeichnet wird und unterschiedliche Formen aufweisen kann. Manche Viren besitzen zudem eine Membran, die als Virushülle bezeichnet wird. Der evolutionäre Ursprung von Viren ist nicht eindeutig geklärt. Man vermutet, dass manche aus Plasmiden entstanden sind, andere sich „selbstständig“ gemachten RNA- oder DNA-Molekülen der Wirtszelle entsprechen (Luria, 1960). Einen bedeutenden Einfluss haben Viren aufgrund der Möglichkeit des horizontalen Gentransfers, womit sie entscheidend zur genetischen Vielfalt von Mikroorganismen beitragen (Canchaya et al., 2003).

1962 entwickelten André Lwoff, Robert Horne und Paul Tournier erstmals ein System, das, basierend auf dem System von Linnés, eine Einteilung der Viren ermöglichte (Lwoff et al., 1962). 1971 folgte die Gründung des *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), wobei Viren in unterschiedliche Ordnungen, Familien,

Unterfamilien, Gattungen und schließlich die Spezies selbst gegliedert werden. Im selben Jahr veröffentlichte der spätere Nobelpreisträger David Baltimore die Baltimore-Klassifikation (Baltimore, 1971). Bei dieser Einteilung ist der Mechanismus der mRNA-Produktion entscheidend. Das virale Genom kann dabei einzelsträngig (ss) oder doppelsträngig (ds) sein, aus RNA oder DNA bestehen und Reverse Transkriptase zum Umschrieb von RNA in DNA verwenden oder nicht. Das Genom einzelsträngiger RNA-Viren kann außerdem sense (+) oder antisense (-) orientiert sein, je nachdem, ob die RNA als Muster dient oder direkt als mRNA vorliegt.

<u>Gruppe</u>	<u>Genom</u>	<u>Beispiel</u>
I	dsDNA	Adenoviren, Herpesviren, Pockenviren
II	ssDNA	Parvoviren
III	dsRNA	Reoviren
IV	(+)ssRNA	Picornaviren, Togaviren
V	(-)ssRNA	Orthomyxoviren, Rhabdoviren
VI	ssRNA-RT	Retroviren
VII	dsDNA-RT	Hepadnaviren

**Tabelle 1** Einteilung von Viren nach der Baltimore-Klassifikation (Baltimore, 1971)

### 1.3.1 Erkennung viraler Nukleinsäuren durch das angeborene Immunsystem

Wie bereits oben beschrieben, verfügt das angeborene Immunsystem über eine Reihe von *Pattern recognition*-Rezeptoren, mit deren Hilfe spezifische Muster viraler Nukleinsäuren erkannt werden können. Die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) sind als Transmembranproteine besonders geeignet, um virale Bestandteile außerhalb der Zelle sowie in intrazellulären Vakuolen, so genannten Endosomen, zu erkennen. Von den mehr als zehn TLRs sind die Rezeptoren TLR3, TLR7/8 und TLR9, welche überwiegend in Endosomen lokalisiert sind, an der Erkennung von Nukleinsäuren beteiligt (Takeuchi and Akira, 2009). Dabei wird TLR3 von doppelsträngiger RNA (dsRNA), TLR7/8 von einzelsträngiger RNA (ssRNA) und TLR9 von DNA mit CpG-Motiven aktiviert (Takeuchi and Akira, 2009).

Die im Zytosol lokalisierten RIG-I-ähnlichen Helikasen erkennen bestimmte Muster viraler Nukleinsäuren und können im Folgenden eine Typ I Interferonantwort auslösen. Im Gegensatz zu den *Toll-like*-Rezeptoren ist jedoch über die genauen Eigenschaften der Liganden deutlich weniger bekannt. Bisher ging man davon aus, dass RIG-I RNAs mit einer 5'-Triphosphat-Modifikation (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006) sowie kurze doppelsträngige RNAs (Kato et al., 2008) erkennt, MDA5 hingegen lange doppelsträngige RNAs (Kato et al., 2008).

Durch Studien mit Knockout-Mäusen für die jeweiligen RLRs konnte gezeigt werden, welche RNA-Viren von RIG-I bzw. MDA5 erkannt werden. So werden von RIG-I die Paramyxoviridae Sendai-Virus (SV) und Newcastle disease-Virus (NDV), Orthomyxoviridae wie Influenza-Virus, Rhabdoviridae wie Vesicular stomatitis-Virus (VSV) und Flaviviridae wie Japanese encephalitis-Virus (JEV) und Hepatitis C-Virus (HCV) erkannt (Kato et al., 2005; Kato et al., 2006; Melchjorsen et al., 2005; Sumpter et al., 2005). MDA5 löst dagegen nach Infektion mit den Picornaviridae Encephalomyocarditis-Virus (EMCV), Theiler's Virus und Mengo-Virus eine Interferonantwort aus (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006). Die Flaviviridae West Nile-Virus und Dengue Virus sowie das zur Familie der Reoviridae zählende Reovirus werden sowohl von RIG-I, als auch von MDA5 erkannt (Kato et al., 2008).

## 1.4 Fragestellung

Die Kenntnis über die exakten Eigenschaften von DNA und RNA, die zu deren Erkennung durch *Pattern recognition*-Rezeptoren führen sowie die Entschlüsselung der nachfolgenden Signalkaskaden sind von großem wissenschaftlichem Interesse. Dieses Wissen ist besonders bei der Entwicklung neuer Pharmaka von Bedeutung, welche eine kontrollierte Aktivierung des körpereigenen Immunsystems zur Bekämpfung von Infektions- und Tumorerkrankungen ermöglichen.

Im Falle der Helikase RIG-I wurde zu Beginn dieser Arbeit über die genauen Merkmale viraler RNA, welche zu einer RIG-I-vermittelten Interferonantwort führen, noch kontrovers diskutiert. So wurde vermutet, dass doppelsträngige RNA zu einer Aktivierung von RIG-I führt (Yoneyama et al., 2004). 2006 konnten Hornung et al. und Pichlmair et al. zeigen, dass eine 5'-Triphosphat-Modifikation, wie sie unter anderem von viralen Polymerasen erzeugt wird, als Erkennungsmuster einer RIG-I-getriggerten Immunantwort dient (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Dass eine 5'-Triphosphat-Modifikation das einzige Erkennungsmuster ist, das von RIG-I erkannt wird, wurde jedoch durch eine Reihe von weiteren Studien in den folgenden Jahren in Frage gestellt. Malathi et al. beschrieben 2007, dass durch RNase L gebildete 3'-Monophosphat-RNAs als RIG-I-Liganden agieren (Malathi et al., 2007). In anderen Studien wurde vermutet, dass eine 5'-Triphosphat-Modifikation nicht notwendig sei, wenn die RNA doppelsträngig vorliege und entweder 5'-Monophosphate besitze oder ausreichend lang sei (Kato et al., 2008; Takahashi et al., 2008). Auch konnte gezeigt werden, dass die Sequenz der viralen RNA Einfluss auf die Erkennung via RIG-I hat. So beschrieben Saito et al. 2008, dass RIG-I-Liganden Uridin- oder Adenosin-reiche

Sequenzen benötigen, um eine Interferonantwort auslösen zu können (Saito et al., 2008).

Diese Studien warfen die Frage auf, ob die 5'-Triphosphat-Modifikation viraler RNA alleine ausreichend ist, um zu einer Erkennung durch das Immunsystem via RIG-I zu führen, oder zusätzliche Merkmale, wie beispielsweise bestimmte Sequenzen, vorhanden sein müssen. Daher sollten in der folgenden Arbeit mittels definierter Liganden die strukturellen Eigenschaften des molekularen Musters im Detail charakterisiert werden, die erforderlich sind, um eine RIG-I-abhängige Interferonantwort auszulösen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte, Verbrauchsmittel und Reagenzien

##### 2.1.1.1 Geräte

Alpha Imager HP	Fa. Alpha Innotech (San Leandro, CA, USA)
Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
Entwickler Curix 60	Fa. AGFA (Köln, D)
FluoroMax-P Fluorimeter	Fa. Horiba Jobin Yvon (Unterhaching, D)
GE Ettan LC System	Fa. GE Healthcare (München, D)
Laminar Air Flow Werkbank (HB2448)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop	Fa. Zeiss (Jena, D)
Multiplate Reader Mithras LB 940	Fa. Berthold Technologies (Bad Wildbach, D)
NanoPhotometer	Fa. Implen (München, D)
pH-Meter SB70P symphony	Fa. VWR (Darmstadt, D)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Fa. Biorad (München, D)
Thermocycler T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Fa. Biorad (München, D)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage LP 6209	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage SBC 21	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Zentrifuge 5415 R	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Fa. Heraeus (Hanau, D)

##### 2.1.1.2 Reagenziensätze

ADP Quest Kinase Assay	Fa. DiscoverX (Hannover, D)
Human Interferon- $\alpha$ Elisa	Fa. Bender MedSystems (Wien, AU)
Human IP-10 ELISA Set	Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
JETQUICK Plasmid Spin Kit	Fa. Genomed (Löhne, D)
Luciferase-Assay Kit	Fa. BioThema (Handen, S)
MegaShortscript T7 Kit	Fa. Ambion (Darmstadt, D)
Monocyte Isolation Kit II	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

### 2.1.1.3 Chemikalien

#### ELISA

Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Bovine serum albumin (BSA)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

#### Größenausschluss-Chromatographie

Superose 6 PC 3.2/30 Trennsäule	Fa. GE Healthcare (München, D)
---------------------------------	--------------------------------

#### In-vitro-Transkription

Alexa Fluor 488–5-UTP	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Chloroform	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol absolut	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Mini Quick Spin Oligo Columns	Fa. Roche (Mannheim, D)
MinElute Gel Extraction Kit	Fa. Quiagen (Hilden, D)
Phenol-Chloroform	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

#### Luciferase-Assay

Coelenterazine	Fa. Promega (Mannheim, D)
Passive lysis buffer	Fa. Promega (Mannheim, D)

#### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Ammoniumpersulfat (APS)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Blotting-Papier	Fa. Schleicher & Schuell (Dassel, D)
Bromphenolblau	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Enhanced chemiluminescence detection system (ECL)	Fa. Amersham (Little Chalfont, GB)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Glycin	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Methanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
β-Mercaptoethanol	Fa. Biorad (München, D)
Milchpulver	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Nitrocellulosemembran	Fa. Amersham (Little Chalfont, GB)
Prestained protein molecular weight marker	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)	Fa. Amersham (Braunschweig, D)
Rotiporese Gel 30 (37,5:1)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
TRIS-Hydrochlorid	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

Transfektion

Fugene	Fa. Roche (Mannheim, D)
Genejuice	Fa. Merck Chemicals (Darmstadt, D)
Lipofectamine 2000	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Lipofectamine RNAiMax	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Visualisierung

Agarose	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethidiumbromid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Formamid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Harnstoff	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Rotiphorese Gel 40	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
SiRNA-Marker	Fa. New England Biolabs (Frankfurt a. M., D)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Zellkultur

Aqua ad injectabilia	Fa. Braun (Melsungen, D)
Biocoll-Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Calciumchlorid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Fetales Kälberserum	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Heparin-Natrium	Fa. Braun (Melsungen, D)
Insulin, Lösung vom Rinderpankreas	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Leibovitz L-15 Medium	Fa. PAA (Linz, A)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
MCDB 153	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Optimem	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ortho-mune Lyse-Reagenz	Fa. OrthoClinical Diagnostics (Neckarsgmünd, D)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
Phosphate-buffered saline (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Zelllyse

Glycerin	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Natriumorthovanadat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Nonidet P-40	Fa. Fluka Biochemika (Buchs, CH)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fa. Fluka Biochemika (Buchs, CH)



Protease inhibitor cocktail tablets

Fa. Roche (Mannheim, D)

Enzyme und Sonstiges

Calf intestine alkaline phosphatase, CIAP

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

Desoxyribonukleotide

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

ExoKlenow

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

Pfu-Polymerase

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

RNase-Inhibitor

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

## 2.1.1.4 Materialien für die Zellkultur

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning, USA) bezogen.

## 2.1.1.5 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Medien und Puffer für die ZellkulturDMEM-Vollmedium

100 IU/ ml Penicillin

100 µg/ ml Streptomycin

1,5 mM L-Glutamin

10 Vol % FCS

in DMEM-Medium

RPMI-Vollmedium

100 IU/ ml Penicillin

100 µg/ ml Streptomycin

1,5 mM L-Glutamin

10 Vol % FCS

in RPMI-1640-Medium

1205LU-Medium

80 Vol % MCD153

18 Vol % Leibovitz L-15

2 Vol % FCS

5 µg/ml Insulin

1,68 mM CaCl<sub>2</sub>MACS-Puffer

2 mM EDTA

0,5 Vol % BSA

in PBS

Erythrozyten-Lysepuffer

Ortho-mune Lyseagenz

in PBS

Lösungen für molekularbiologische MethodenLaufpuffer

192 mM Glycin

25 mM Tris-Base

0,1 Vol % SDS

in Aqua dest.

Transferpuffer

192 mM Glycin

25 mM Tris-Base

10 Vol % Methanol

in Aqua dest.

TBE-Puffer

89 mM Tris

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

pH 8,3 in Aqua dest.

PBS-Tween

0,1 Vol % Tween 20

in PBS

Blocking Lösung

5 Vol % Milchpulver

in PBS-Tween

Hybridisierungspuffer

10 mM Tris-Base

1 mM EDTA

pH 7,4 in Aqua dest.

<u>Lysepuffer</u>	<u>Lämmli-Puffer (5-fach)</u>	<u>RNA-Elutions-Puffer</u>
10 Vol % Glycerol	250 mM Tris-HCL (pH 6,8)	0,5 M Ammoniumacetat
20 mM Tris-HCl (ph 7)	40 Vol % Glycerol	1 mM EDTA
137 mM NaCl	5 % (w/v) SDS	0,2% SDS
2 mM EDTA	10 Vol % Mercaptoethanol	
1 Vol % NP-40	0,05 % (w/v) Bromphenolblau	
1 mM PMSF	in Aqua dest.	
1 x Protease inhibitor tablet		
1 mM Natriumorthovanadat		
in Aqua dest.		

<u>Chromatographie-Puffer</u>	<u>Anisotropie-Assay-Puffer</u>
30 mM Tris-HCl, pH 7,5	30 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl	150 mM NaCl
2 mM DTT	5 mM 2-Mercaptoethanol
10 µM ZnCl <sub>2</sub>	10 µM ZnCl <sub>2</sub>

## 2.1.2 Zellen, Nukleotide und Proteine

### 2.1.2.1 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Zellart</u>	<u>Herkunft</u>
Hek293	Humane embryonale Nierenzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC)
1205LU	Humane Melanomzellen isoliert aus einer Lungenmetastase	M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA)

### 2.1.2.2 Sequenzen von RNA-Oligonukleotiden und Small-interfering-RNAs

#### RNA

<u>Typ</u>	<u>Modifikation</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz (5'→3')</u>
syn	5'-OH	2.2s	GCAUGCGACCUCUGUUUGA
		2.2as	UCAAACAGAGGUCGCAUGC
		2.2 5mer	UCAA
		2.2 10mer	UCAAACAGAG
		2.2 15mer	UCAAACAGAGGUCGC
		2.2 18mer	UCAAACAGAGGUCGCAUG
		2.2 5mer'	CAUGC
		2.2 10mer'	GGUCGCAUGC
		2.2 15mer'	ACAGAGGUCGCAUGC
		2.2as/s hp	GUCAAACAGAGGUCGCAUGC
			CGGCAUGCGA
IVT	5'-ppp	2.2s	GGCAUGCGACCUCUGUUUGA
		2.2as	GUCAAACAGAGGUCGCAUGC
		2.2s/as hp	GGCAUGCGACCUCUGUUUGA
			UCAAACAGA
		2.2as/s hp	GGUCGCAUGCC
			GUCAAACAGAGGUCGCAUGC
			CGGCAUGCGA

		Klon 1	CCUCUGUUUGAC
		Klon 9	GGCAUGCGACCUCUGUUUGAUCAGAGGU
		SeVL	GGCAUGCGACCUCUGUUUGAGGUCGAUG
			ACCAAACAAGAGAAGAAACAUGUAUGGAAU
			AUAUAAUGAAGUUAGACAGGAA
syn3p 5'-ppp	2.2s		GCAUGCGACCUCUGUUUGA
	2.2as/s hp		GUCAAACAGAGGUCGAUGCGGCAUGCGA
			CCUCUGUUUGAC

### siRNA

Zielprotein	Sequenz (5'→3')
RIG-I	ATCACGGATTAGCGACAAA
MDA-5	GTATCGTGTTATTGGATTA
PKR	GAAGGCAGTTAGTCCTTTA
Cardif	CCACCTTGATGCCTGTGAA
CO4 (Kontroll-siRNA)	GCGCAUUC CAGCUUACGUA

Die angegebenen Sequenzen entsprechen dem 19 Nukleotide langen Abschnitt der *Sense*-Strang-mRNA, welcher durch die siRNA erkannt wird. Zusätzlich wurden am 3'-Ende dTdT-Überhänge angehängt.

Chemisch synthetisierte RNAs (5'-OH) sowie Small-interfering-RNAs wurden bei Metabion (Martinsried, D) erworben. Eurogentec (Leiden, Belgien) stellte die chemisch synthetisierte 5'-Triphosphat-RNA her.

### 2.1.2.3 DNA-Primer und –Templates

#### DNA-Templates und Primer

Name	Sequenz (5'→3')
Ambion T7 Promotor Primer	TAATACGACTCACTATA
Template 2.2s	TCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGTCGTA
Template 2.2as	GCATGCGACCTCTGTTTGACTATAGTGAGTCGTA
Template 2.2s/as hp	GGCATGCGACCTCTGTTTGATCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATTTCGC
Template 2.2as/s hp	GTCAAACAGAGGTCGCATGCCGCATGCGACCTCTGTTGACTATATAGTGAGTCGTATTAGAATTTCGC
Template Klon 1	ACCTCTGATCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATTTCGC
Template Klon 9	CATGCGACCTCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATTTCGC
Template SeVL	TTCCTGTCTAACTTCATTATATATTCCATACATGTTTCTTCTCTTGTTTGGTTATAGTGAGTCGTATTAGAATTTCGC

DNA-Primer und -Templates wurden von Metabion (Martinsried, D) bezogen.

#### 2.1.2.4 Plasmide

##### Plasmid-DNA kodierte Proteine

<u>Gen</u>	<u>Vektor</u>	<u>Charakteristika</u>
RIG-I	pSfiExpress	HA-Tag am C-terminalen Ende
p125-Firefly-Luziferase	pGL3	Ampicillin-Resistenz, kein Tag
Renilla-Luziferase	pGL3	Ampicillin-Resistenz, kein Tag

#### 2.1.2.5 Proteinkonstrukte

##### Rekombinante Proteine

<u>Name</u>	<u>Aminosäuren</u>	<u>Referenz</u>
RIG-I wt	1-925	RIG-I WT aus Cui et al., 2008 (Cui et al., 2008)
RIG-I CARD-less	230-925	ΔCARD-RIG-I aus Cui et al., 2008 (Cui et al., 2008)
RIG-I RD	802-925	RD (RIG-I) aus Cui et al., 2008 (Cui et al., 2008)

Rekombinante Proteine wurden von Herrn Cui aus dem Labor Prof. Hopfner (Genzentrum, LMU München) zur Verfügung gestellt. RIG-I wt und RIG-I CARD-less wurden in Insekten-zellen (High-five insect cells, Invitrogen) exprimiert, das RIG-I RD-Konstrukt in E.coli BL21 Rosetta Zellen (Novagen).

#### 2.1.2.6 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Herkunft</u>
Anti-RIG-I, monoklonal, aus der Ratte	zur Verfügung gestellt durch Elisabeth Kremmer, Helmholtz-Zentrum

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellulär-immunologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zellkultur

##### Allgemeine Wachstumsbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5-prozentigen CO<sub>2</sub>-Luft-Gemisch. Sämtliche

Experimente mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Air-Flow Werkbank durchgeführt.

#### Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in Kulturfラスchen von 25 bis 75 ml Größe gehalten. HEK293-Zellen wurden in DMEM-Vollmedium, humane Melanomzellen in 1205LU-Medium kultiviert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, überschüssige Zellen wurden verworfen. Die Begutachtung der Zellen auf Infektionen und Zelltod erfolgte mit dem Lichtmikroskop. Für Experimente erfolgte eine Kultivierung der Zellen in 6- bis 96-well-Flachbodenplatten.

#### Kultivierung von humanen Monozyten

Die Kultivierung von humanen Monozyten aus peripherem Blut erfolgte in 96-well-Flachboden-Platten in RPMI-Vollmedium.

#### Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt, wobei sich tote Zellen im Gegensatz zu lebenden blau anfärben. Die Zellzahl wurde nach geeigneter Verdünnung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

### 2.2.1.2 Aufreinigung von Zellpopulationen

#### 2.2.1.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Isolation der PBMCs erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Hypaque-Lösung. Aufgrund der spezifischen Dichte von 1,077 g/ml hat Ficoll die Eigenschaft, in einer Dichtezentrifugation mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze zwischen Serum und Ficoll anzureichern. Dieser Leukozytenring wird als *Buffy coat* bezeichnet. Wegen ihrer höheren Dichte sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten in bzw. unter die Ficollschicht, wohingegen sich Thrombozyten wegen ihrer geringeren Dichte in der Serumschicht oberhalb des Ficoll finden.

Gesunden Spendern wurde 200 ml Blut abgenommen, das mit 10 IE Heparin/ml Blut heparinisiert wurde. Das Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS-Puffer verdünnt und auf 50 ml-Leukosept-Röhrchen verteilt, in die zuvor 15 ml Ficoll-Lösung durch kurzes Zentrifugieren unter die Separationsmembran gebracht wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 Minuten bei 1000 G und 20 °C. Der *Buffy coat* wurde in neue

50 ml-Röhrchen überführt, diese mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10 min, 400 G, 20 °C). Nach einem weiteren Waschschrift wurde zunächst der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 1 ml NaCl resuspendiert und alle Suspensionen in ein neues 50ml-Röhrchen gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation (7 min, 400 G, 4 °C) wurde das Zellpellet in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um verbleibende Erythrozyten zu lysieren. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium bzw. in MACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl wie oben beschrieben ermittelt.

#### 2.2.1.2.2 Isolation von humanen Monozyten mittels magnetischer Zellsortierung

Für die Isolation von humanen Monozyten aus PBMCs wurde die *magnetic activated cell sorting* (MACS)-Methode angewendet. Dabei werden biotinylierte Antikörper verwendet, welche gegen zellspezifische Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Diese werden in einem zweiten Schritt von gegen Biotin gerichteten Antikörpern erkannt, welche an paramagnetische Mikropartikel von ca. 50 nm Durchmesser gekoppelt sind. Diese markierte Zellsuspension wird anschließend auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält und sich im Magnetfeld eines Permanentmagneten befindet. Somit werden alle markierten Zellen in der Matrix zurückgehalten, nicht markierte Zellen hingegen durch mehrfaches Spülen mit MACS-Puffer entfernt. Die *Bead*-gekoppelten Zellen können danach außerhalb des Magnetfelds mit starkem Druck aus der Säule gespült werden. Die beschriebene Methode eignet sich sowohl zur Anreicherung (Positiv-Selektion) einer bestimmten Zellpopulation, als auch zum Ausschluss (Depletion) von Zellpopulationen. In dieser Arbeit wurde das *Monocyte Isolation Kit II* gemäß dem Herstellerprotokoll von *Miltenyi Biotech* verwendet.

#### 2.2.1.3 Transfektion und Stimulation von Zellen

Transfektion und Stimulation bezeichnen hier zwei Vorgänge, die beide als Ziel das Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellen haben. Dabei bedient man sich Transfektionsreagenzien, die durch die Bildung von Liposomen die Nukleinsäure in ihr Inneres einschließen und nach Fusion mit der Zellmembran in die Zelle freisetzen.

##### 2.2.1.3.1 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Tumorzellen

Für Luciferase-Assays mit HEK293-Zellen ( $2 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l/well in 96-well-Platten) erfolgte eine RIG-I-Überexpression mit 10 ng Plasmid-DNA durch transiente

Transfektion. Im selben Schritt wurden je 40 ng Plasmid-DNA für *Firefly*-Luciferase und *Renilla*-Luciferase transfiziert. Die Bedingungen wurden mit Plasmid-DNA für *green fluorescent protein* (GFP) auf 200 ng Gesamt-DNA aufgefüllt. Zur Transfektion wurden 0,5  $\mu$ l *Genejuice* nach dem Protokoll von *Novagen* verwendet. Der Transfektionserfolg wurde mittels Fluoreszenzmikroskop überprüft. Nach 24 Stunden erfolgte die Stimulation der Zellen.

#### 2.2.1.3.2 Stimulation von primären Zellen und Tumorzellen mit RNA

##### *Stimulation von humanen Monozyten*

Für die Stimulation von humanen Monozyten wurden 96-Well-Flachboden-Platten verwendet, wobei je Bedingung  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l Medium ausplattiert wurden. Das Einbringen der entsprechenden Liganden erfolgte durch Verdünnung von 200 ng RNA und 0,5  $\mu$ l *Lipofectamin 2000* (*Invitrogen*) in jeweils 25  $\mu$ l Serum-freiem Medium. Nach fünf Minuten Inkubation wurden diese zwei Vorverdünnungen zusammengegeben und nach weiteren 20 Minuten das gesamte Volumen dem Zellmedium hinzugefügt. Nach 36-stündiger Inkubationszeit wurden die Überstände für die Zytokinmessung mittels ELISA abgenommen.

##### *Stimulation von Tumorzellen*

HEK293-Zellen wurden auf selbe Weise wie humane Monozyten stimuliert. Die Stimulation von 1205LU-Zellen erfolgte mit *Lipofectamin RNAiMax* nach den Herstellerangaben (*Novagen*).

#### 2.2.1.3.3 Posttranskriptioneller Gen-*Knock-Down* durch siRNA

Für die Versuche mit *Small-interfering-RNA* (siRNA) in 1205LU-Melanomzellen wurden  $10^5$  Zellen in einer 24-well-Platte in 200  $\mu$ l Medium kultiviert. Nach zwölf Stunden wurden 10 pmol der jeweiligen siRNA mit 1,5  $\mu$ l *Lipofectamin RNAiMax* in 150  $\mu$ l Optimum transfiziert. 24 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden mit 200 ng RNA stimuliert. Dabei wurden erneut 10 pmol der jeweiligen siRNA mit *Lipofectamin RNAiMax* transfiziert.

#### 2.2.1.4 Enzyme-linked immunosorbent assay zur Quantifizierung von IFN- $\alpha$ und IP-10

Für die Konzentrationsbestimmung bestimmter Zytokine im Überstand von Zellkulturen wurde der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) angewendet. Dabei werden die jeweiligen Proben auf bereits mit Protein-spezifischen Antikörpern (*Capture*-Antikörper) beschichtete Polystyrene-Platten gegeben. Das daran gebundene Protein

kann nun durch einen zweiten Antikörper (*Detection*-Antikörper) an einem anderen Epitop gebunden werden, wobei der *Detection*-Antikörper entweder direkt an eine Peroxidase gekoppelt ist, oder die Peroxidase über Biotin-Streptavidin-Brücken gebunden wird. Die Meerrettich-Peroxidase kann nun nach Zugabe des entsprechenden Substrats dieses in Farbe umsetzen, wobei die Farbintensität direkt proportional zur gesuchten Proteinmenge ist. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure kann die Farbintensität bei 450 nm Wellenlänge in einem *Multi-Plate-Reader* ausgelesen werden. Die Quantifizierung erfolgt über eine Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration.

IFN- $\alpha$  wurde in zellfreien Kulturüberständen nach 36 Stunden Stimulation quantifiziert. Der ELISA wurde nach den Empfehlungen des Herstellers Bender Systems verwendet. Für die Quantifizierung von IP-10 nach 12 Stunden Stimulation wurde das *OptEIA Human IP-10 ELISA Set* nach den Empfehlungen von BD Biosciences verwendet.

#### 2.2.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und *Western Blot*

##### Allgemeines Funktionsprinzip

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Als Trennmedium dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis, wobei der Anteil des Acrylamids die Porengröße des Gels bestimmt. Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt als anionisches Tensid die Proteineigenladungen und sorgt für eine konstant negative Ladungsverteilung der Proteine. Zusätzlich werden die Proben vor dem Laden auf das Gel für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen.

Nach dem Laden der Proben auf das Polyacrylamidgel wird durch das Anlegen elektrischer Spannung die Migration der Proteine gestartet. Dabei wandern die Proteine umso schneller, je kleiner sie sind. Am Ende des Vorgangs sind alle Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zur Größenabschätzung dient ein Marker mit bekannten Proteingrößen.

Anschließend wird das aufgetrennte Proteingemisch aus der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (engl. *blot*). Durch ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld wandern die Proteine aus dem Gel auf die Membran und verbleiben dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Die Abstände der Proteinauftrennung bleiben dabei erhalten. Nachdem freie Bindungsstellen durch Milchproteine geblockt wurden, können die gesuchten Proteine mittels spezifischer



Antikörper (Primärantikörper) detektiert werden. Mehrfache Waschschritte reduzieren das Auftreten unspezifischer Antikörperbindungen. In einem nächsten Schritt erfolgt die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist und zudem an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Dieses ist in der Lage, das Substrat Luminol in seine oxidierte Form zu bringen, wobei die auftretende Chemolumineszenz durch einen Photofilm detektiert werden kann.

### Versuchsablauf

Die zu analysierenden Lysate wurden mit 2-fach SDS-haltigem Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Zur Auftrennung wurden Gele mit einem Volumenanteil von 10 % Acrylamid bei einer Stromstärke von 30 mA verwendet. Der Transfer erfolgte mit dem *Semidry-blot-System* von *Biorad* bei 50 mA über eine Zeit von 90 Minuten. Der Transferpuffer enthielt 10 % Methanol. Für das anschließende Blocken wurde PBSTween-Lösung mit 5 % Milch verwendet. Der Anti-RIG-I-Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:3000 in PBS mit 2 % BSA verwendet. Der Sekundärantikörper wurde 1:5000 in PBSTween-Lösung mit 5 % Milch verdünnt. Die Membran wurde zwei Stunden bei 20 °C mit der Antikörperlösung umspült. Jeder Waschschritt erfolgte für dreimal 10 Minuten in PBSTween-Lösung. Zur Visualisierung wurde die Membran mit 1 ml ECL-Substrat benetzt und die Filme in der Dunkelkammer belichtet.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 *In vitro*-Transkription

#### Allgemeines Funktionsprinzip

Die *in vitro*-Transkription ist ein molekularbiologisches Verfahren zur enzymatischen Erzeugung von RNAs im zellfreien Milieu. Dabei wird von einem DNA-Strang (*Template*) mit Hilfe DNA-abhängiger RNA-Polymerasen ein RNA-Strang synthetisiert, der komplementär zur Sequenz des *Template*-Strangs ist. Häufig findet dabei die T7-RNA-Polymerase Verwendung. Als Besonderheit weist die *in vitro* transkribierte RNA (IVT-RNA) eine 5'-Triphosphat-Gruppe auf, die beim Einbau des ersten Nukleotids entsteht.

Nach der RNA-Synthese wird das *Template* mit DNasen verdaut und die Enzyme mit Ammoniumacetat denaturiert. Anschließend wird die RNA mittels Phenol-Chloroform-

Extraktion isoliert, welche auf der unterschiedlichen Löslichkeit von Proteinen und Nukleinsäuren in einer zweiphasigen Emulsion beruht. Dabei sammeln sich die denaturierten Proteine in der unteren organischen Phase, während die RNA in der oberen wässrigen Phase gelöst bleibt. Mit Hilfe von Ethanol kann schließlich die RNA bei -20 °C gefällt werden. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstands, kann das *Pellet* in RNase-freiem Wasser resuspendiert werden. Mittels Säulenchromatographie können anschließend noch einzelne Basen und kurze Oligonukleotide entfernt werden.

#### Versuchsablauf

Für die *Template*-Herstellung wurden zunächst 10 µl DNA-Hybridisierungspuffer, 2 µl *T7 Promoter-Primer* und 2 µl *DNA-Template* in ein *PCR-Tube* gegeben und für 5 Minuten im Thermocycler auf 70 °C erhitzt und anschließend langsam wieder auf Raumtemperatur gekühlt, so dass der *Primer* an das *Template* binden konnte. Nun wurden 5 µl RNase-freies Wasser, 2 µl *Klenow Fill-In* Puffer, 2 µl Desoxyribonukleotid-Triphosphat-Mix und 1 µl *ExoKlenow* DNA-Polymerase dazu gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um anschließend die DNA-Polymerase zu inaktivieren, wurde das *PCR-Tube* im *Thermocycler* für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Das darin befindliche *Template* konnte nun für die Transkription verwendet werden.

Das Ansetzen der Transkription erfolgte mit dem *MegaShortscript T7 Kit (Ambion)* in einem weiteren *PCR-Tube*. Dazu wurden 6 µl RNase-freies Wasser, 2 µl *10xT7 Rxn* Puffer, je 2 µl ATP, GTP, CTP und UTP (je 75 mM), 2 µl *DNA-Template* und 2 µl *T7 RNA-Polymerase* hinein gegeben und der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Durch die Zugabe von 1 µl Turbo-DNase und erneuter Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wurde das *DNA-Template* verdaut. Mit 15 µl Ammonium-Acetat wurde die DNase inaktiviert, der gesamte im *PCR-Tube* befindliche Inhalt in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt und mit 115 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA erfolgte im ersten Schritt durch Zugabe von 150 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, kurzem Schütteln und anschließender Zentrifugation bei 12000 G für 5 Minuten. Die obere Phenol-Phase wurde in ein weiteres 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt und der zweite Aufreinigungsschritt erfolgte mit 150 µl Chloroform. Das Ausfällen der RNA erfolgte durch Zugabe von 300 µl Ethanol absolut auf das Phenol-RNA-Gemisch bei -20 °C für mindestens zwei Stunden. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 14000 G wurde der Überstand dekantiert und das *Pellet* in 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Um die nicht inkorporierten Nukleotide sowie kurze RNAs mit Längen unter acht Nukleotiden zu entfernen, wurden *Mini Qick Spin Columns (Roche)* entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die Konzentration der RNA wurde mit dem *NanoPhotometer* der Firma *Implen* durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm ermittelt.

#### Transkription der fluoreszenzmarkierten RNA

Für die Transkription der fluoreszenzmarkierten RNA für die Protein-RNA-Bindungsstudien wurde *Alexa Fluor 488-5-UTP* der Firma *Invitrogen* verwendet. Das Verhältnis von *Alexa Fluor 488-5-UTP* zu nichtmarkiertem UTP betrug dabei 1:3.

#### 2.2.2.2 RNA-Auftrennung mittels denaturierender Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

##### Allgemeines Funktionsprinzip

Die Analyse von RNAs erfolgte mittels denaturierender Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Das Prinzip dieser Technik besteht darin, dass durch die Polymerisation des zunächst flüssigen Acrylamids eine Gitterstruktur entsteht, worin die negativ geladene RNA nach dem Anlegen einer Spannung je nach Größe unterschiedlich schnell wandert. Je kürzer die RNA ist, desto schneller läuft sie im Gel. Der im Gel enthaltene Harnstoff dient der Denaturierung der RNA, indem er die Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Basen der Nukleotide, und somit Sekundärstrukturen der RNA, verhindert.

##### Versuchsablauf

Entsprechend den kurzen zu analysierenden RNA-Sequenzen wurde ein 20-prozentiges Polyacrylamidgel verwendet. Dafür wurden 7,2 g Harnstoff zu 1,5 ml 10-fach TBE-Puffer sowie 6,8 ml 40 % Acrylamid gegeben. Nach kurzem Erwärmen zur besseren Harnstofflösung, wurde der Ansatz auf 15 ml mit sterilem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden 75  $\mu$ l zehn-prozentiges Ammoniumpersulfat (APS) und 15  $\mu$ l Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator in die Mischung gegeben und diese in eine Haltevorrichtung für Gele gefüllt. Nach etwa 30 Minuten war das Gel vollständig polymerisiert.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte in 1,5ml-Eppendorfgefäßen. Dafür wurde zu 15  $\mu$ l Ladepuffer (90 % Formamid, 10 % TBS) die gewünschte RNA-Menge gegeben. Für die Größenanalyse der RNAs wurden 0,5 bis 2  $\mu$ g RNA verwendet, für Reisolationen 10  $\mu$ g RNA. Vor dem Beladen der Proben wurden diese für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Um während der Auftrennung weiterhin denaturierende Bedingungen zu erhalten, wurde der Laufpuffer (0,3-fach TBE) konstant über 65 °C gehalten. Die für die Elektrophorese

angelegte Spannung betrug 200 V. Zur Visualisierung wurde das Gel anschließend mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) angefärbt und unter UV-Licht beurteilt.

#### 2.2.2.3 RNA-Isolation aus Polyacrylamidgelen

Für die Isolation einzelner RNA-Banden aus einem Polyacrylamidgel wurden diese nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ausgeschnitten, zerkleinert und in 1,5ml-Eppendorfgefäße gegeben. Diese wurden mit RNA-Elutions-Puffer (0,5 M Ammoniumacetat; 1 mM EDTA; 0,2% SDS) aufgefüllt und für zwölf Stunden in einem Thermo-Schüttler bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung der RNA mit nachfolgender Alkoholfällung.

#### 2.2.2.4 Sequenzierung von cDNA der *in vitro* transkribierten RNA

Für die Herstellung von cDNA der reisolierten *in vitro* transkribierten RNA wurde diese zunächst mittels Poly(A)-Polymerase polyadenyliert. Anschließend wurde die RNA mit *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) behandelt und es erfolgte die Ligation eines RNA-Adapters an die 5'-Phosphat-Gruppe. Mit Hilfe eines Oligo-dT-Adapter-Primers wurde nun mit M-MLV-RNaseH-Reverser Transkriptase Erst-Strang-cDNA generiert. In 16 Zyklen wurde anschließend die erzeugte cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf eine Konzentration von ca. 40 ng/µl amplifiziert. Um anschließend eine T/A-Klonierung durchführen zu können, erfolgte die PCR mit Taq-DNA-Polymerase, welche jeweils ein 3'-Adenin-Überhang an beiden Enden des PCR-Produktes erzeugt. Die hier beschriebenen Schritte wurden von der Firma *vertis Biotechnologie AG* (Freising, D) durchgeführt.

Die cDNA wurde anschließend in den *pCR®2.1-Vektor* unter Anwendung des *TA Cloning® Kit (Invitrogen)* kloniert. Die *Inserts* wurden mittels M13-Vorwärts- und Rückwärts-Primer von beiden Seiten sequenziert. Aus der Sequenz zwischen dem Poly-A-Schwanz und dem 5'-Adapter konnte nun auf die ursprüngliche RNA-Sequenz geschlossen werden.

#### 2.2.2.5 Luciferase Assay

##### Allgemeines Funktionsprinzip

Der Luciferase-Assay wird zur Analyse der Promotor-Aktivität bestimmter Gene verwendet. Luciferasen sind Enzyme, die in der Lage sind, Luciferine in Anwesenheit

von Sauerstoff zu oxidieren, wobei energiereiche Zwischenprodukte entstehen, die unter Lichtemission zerfallen.

Der Assay bedient sich zweier verschiedener Luciferasen: Der *Firefly*-Luciferase (*Photinus pyralis*), welche neben Luciferin ATP und  $Mg^{2+}$  als Cofaktoren benötigt, und der *Renilla*-Luciferase (*Renilla reniformis*), welche als Substrat Coelenterazine benötigt. Die Gene beider Enzyme befinden sich auf unterschiedlichen Plasmid-Konstrukten. Das *Firefly*-Luciferase-Gen befindet sich hinter dem IFN- $\beta$ -Promotor und wird daher nur nach dessen Aktivierung abgelesen. Das *Renilla*-Luciferase-Gen befindet sich dagegen hinter dem konstitutiv aktiven CMV-Promotor und wird zur Normalisierung verwendet. Die nach Substratzugabe gemessene Anzahl an Lichtsignalen ist direkt proportional zur Anzahl der jeweiligen exprimierten Luciferase und spiegelt somit die Aktivierung des entsprechenden Promotors wider.

#### Versuchsablauf

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte wie oben beschrieben mit einer Gesamtmenge von 200 ng Plasmid-DNA je Bedingung, wobei je 40 ng *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Konstrukte, 10 ng RIG-I-Konstrukt verwendet und die verbleibende Menge mit *Green-fluorescent-protein*-Konstrukt (GFP) aufgefüllt wurde. Um in späteren Versuchen eine Abhängigkeit bestimmter Liganden von RIG-I nachzuweisen, wurden entsprechende Bedingungen erstellt, in denen keine RIG-I-Überexpression erfolgte. Nach 24-stündiger Kultivierung im Brutschrank erfolgte die Stimulation wie oben beschrieben, im Anschluss daran eine weitere Kultivierung für 12 Stunden. Danach wurde das Medium aspiriert, die Zellen mit 50  $\mu$ l Lysepuffer (*Promega*) versetzt und für 15 Minuten unter Agitation bei Raumtemperatur inkubiert. Je 20  $\mu$ l des entstandenen Zelllysates wurden auf zwei weiße 96-Well-Flachbodenplatten übertragen. Darauf wurden jeweils 20  $\mu$ l des entsprechenden Luciferase-Substrates gegeben und die Lumineszenz in einem *Multi-Plate-Reader* gemessen.

#### 2.2.2.6 ADP-Assay

##### Allgemeines Funktionsprinzip

Enzyme, die eine Kinase-Aktivität besitzen, metabolisieren ATP zu ADP. Ziel des ADP-Assays ist es, das frei werdende ADP mit Hilfe einer Reihe von Sekundärreaktionen zu detektieren. In dem verwendeten Kit (*ADP Quest Assay*) reagiert zunächst ADP mit Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat, welches in einem zweiten Schritt mit Phosphat und Sauerstoff durch die Pyruvatoxidase zu Wasserstoffperoxid,

Acetylphosphat und Kohlendioxid umgewandelt wird. In einem letzten Schritt erfolgt die Umwandlung von Acetyldihydroxyphenoxazin in einen fluoreszierenden Farbstoff durch die Umsetzung des gebildeten Wasserstoffperoxids mit Hilfe einer Peroxidase. Das Fluoreszenzsignal kann anschließend nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 530 nm bei einer Wellenlänge von 590 nm detektiert werden.

#### Versuchsablauf

Für den ADP-Assay wurde je Bedingung ein Gesamtansatz von 10  $\mu$ l in ADP-Assay-Puffer pipettiert. Dabei betrug die Konzentration von RIG-I 100 ng/ml, die des Liganden 1 ng/ml und die ATP-Konzentration 100  $\mu$ M. Nach der Zugabe des ATP erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C. Im Anschluss daran wurde nach dem Protokoll des Herstellers entwickelt und in einer schwarzen 384-Well-Platte in einem *Multi-Plate-Reader* das Fluoreszenzsignal ausgelesen. Als Leerwert wurde eine Bedingung ohne Ligand gewählt. Für jeden Liganden wurde zusätzlich eine Bedingung ohne ATP-Zugabe ermittelt.

#### 2.2.2.7 Größenausschluss-Chromatographie

##### Allgemeines Funktionsprinzip

Die Größenausschluss-Chromatographie ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem Moleküle gelöster Stoffe entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dabei werden Trennsäulen verwendet, die als stationäre Phase ein poröses Polymergranulat enthalten. Dieses erlaubt es, dass kleinere Moleküle darin eindringen, während größeren Molekülen für die Passage lediglich die Zwischenräume zwischen dem Polymergranulat zur Verfügung stehen. Große Moleküle passieren daher schneller die Säule und können früh im Eluat detektiert werden. Kleinere Moleküle sind dagegen in späteren Fraktionen des Eluats zu finden. Die Detektion kann durch Messung der Absorption von UV-Licht definierter Wellenlängen erfolgen.

#### Versuchsablauf

Für die Messung der Homodimerisierung von RIG-I-Molekülen wurde das GE Ettan LC System sowie eine *Superose 6 PC 3.2/30* Trennsäule (*GE Healthcare*) verwendet. Alle Experimente wurden bei 20 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Trennsäule mit Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM DTT; 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) equilibriert. Nach Zugabe der Proben erfolgte die Messung der UV-Absorption bei 260 und 280 nm. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Gel-Filtrations-Standard nach Herstellerangaben von *Bio-Rad*.

### 2.2.2.8 Fluoreszenz-Anisotropie-Assay

#### Allgemeines Funktionsprinzip

Der Fluoreszenz-Anisotropie-Assay ist ein molekularbiologisches Verfahren, das auf dem Prinzip der Fluoreszenzpolarisation beruht. Nach Anregung von Fluorophoren mit linear polarisiertem Licht, emittieren diese erneut linear polarisiertes Licht. Liegen die Fluorophore in einem Medium vor, das ihnen freie Bewegungen im Raum gestattet, hat deren Eigendrehung zusätzlichen Einfluss auf die Fluoreszenzpolarisation. Dabei ist die Rotationsgeschwindigkeit abhängig von der Molekülgröße, an die das Fluorophor gebunden ist, sodass sich Bindungen verschiedener Moleküle anhand des Anisotropiesignals quantifizieren lassen. Die Intensität des Emissionslichts wird dafür in unterschiedlichen Stellungen des Analysators relativ zum Polarisator gemessen.

#### Versuchsablauf

Die Messung der Bindungseigenschaften bestimmter RNAs an unterschiedliche RIG-I-Proteinkonstrukte erfolgte mit dem *FluoroMax-P* Fluorimeter (*Horiba Jobin Yvon*). Dafür wurde 1 ml Assaypuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM 2-Mercaptoethanol; 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) mit fluoreszenzmarkierter *in vitro* transkribierter RNA (hp2.2s/as mit *Alexa Fluor 488-5-UTP*, 50 nM) bei 12 °C in einer Quartz-Küvette präequilibriert. Nach Zugabe der rekombinanten Proteinkonstrukte (300 nM) wurde das Anisotropiesignal bestimmt und als 100% definiert. Anschließend wurde schrittweise nichtmarkierte Kompetitor-RNA hinzugefügt, vorsichtig mit der Pipette gemischt und die Abnahme des Anisotropiesignals gemessen. Dabei war die Abnahme umso größer, je besser der jeweilige RIG-I-Ligand die fluoreszenzmarkierte RNA aus der Proteinbindung verdrängen konnte. Das Anisotropiesignal wurde nach einer Anregung mit 495 nm durch Messung des Emissionslichtes bei 516 nm ermittelt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss der 5'-Modifikation von RNAs auf die Induktion einer Immunantwort sowie die Aktivierung der ATPase-Aktivität von RIG-I

*In vitro* transkribierte RNAs von etwa 20 Nukleotiden Länge sind in der Lage, in den verschiedensten Zellen die Bildung und Ausschüttung von Interferon- $\alpha$  und - $\beta$  auch unabhängig von TLRs auszulösen. Dabei ist die Interferonproduktion abhängig von der 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA, welche bei deren Synthese mit der Phagen-Polymerase T7 entsteht (Kim et al., 2004). Die Interferonantwort erfolgt über die Aktivierung von RIG-I und ist in humanen Monozyten unabhängig vom Signalweg der *Toll like*-Rezeptoren (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Zahlreiche Publikationen in den darauffolgenden Jahren stellten jedoch die 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA als alleinige Voraussetzung einer RIG-I-abhängigen Immunantwort in Frage (siehe Einleitung).

Um die minimal notwendige RNA-Struktur, die zu einer RIG-I-vermittelten Immunantwort führt, zu charakterisieren, wurden verschiedene Versionen der 19 Nukleotide langen Modell-RNA 2.2 verwendet. Diese wurde einerseits chemisch synthetisiert und enthielt an ihrem 5'-Ende eine Hydroxy-Modifikation. Andererseits wurde sie durch die Phagen-Polymerase T7 von einem doppelsträngigen DNA-*Template* transkribiert und verfügte dadurch an ihrem 5'-Ende über eine Triphosphat-Modifikation. Durch Hybridisierung mit dem entsprechenden Gegenstrang wurde von jeder RNA zusätzlich eine doppelsträngige Version hergestellt.

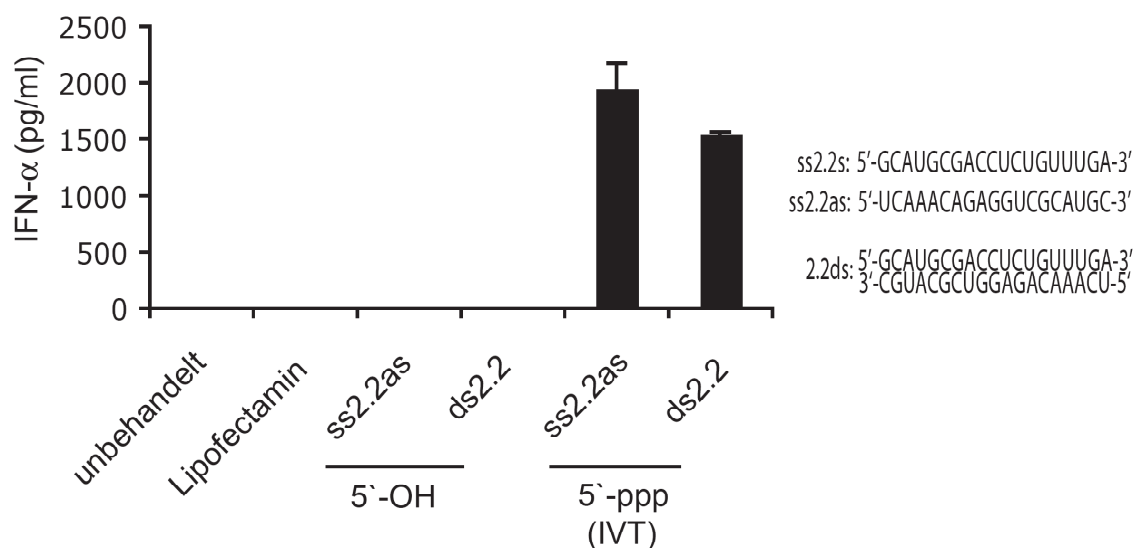
Nachfolgend wird der 2.2-*Sense*-Einzelstrang (5'-GCAUGCGACCUCUGUUUGA-3') mit ss2.2s, der entsprechende Gegenstrang (*Antisense*) mit ss2.2as und der Doppelstrang mit ds2.2 bezeichnet.

##### 3.1.1 Induktion der Interferonproduktion in humanen Blut-Monozyten ist abhängig von der 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA

Zunächst wurden mittels MACS-Technologie isolierte humane Blutmonozyten stimuliert, indem sowohl einzelsträngige, als auch doppelsträngige RNA der Sequenz



2.2 in die Zellen mittels Lipofektion transfiziert wurde. Isolierte humane Monozyten wurden als experimentelles System gewählt, da Vorstudien bereits gezeigt hatten, dass RNA-induzierte Interferonproduktion in diesen Zellen TLR-unabhängig und RLH-abhängig ist und dadurch eine Überlagerung mit TLR-abhängigen Effekten vermieden werden kann (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Nach Transfektion von RNAs, welche enzymatisch durch *in vitro*-Transkription hergestellt wurden und somit eine 5'-Triphosphat-Modifikation besaßen, konnte im Überstand eine signifikante Menge an Interferon- $\alpha$  gemessen werden. Bei der chemisch synthetisierten 5'-OH-RNA hingegen konnte weder nach Stimulation mit dem Einzel-, noch mit dem Doppelstrang eine signifikante Interferon- $\alpha$ -Menge gemessen werden (siehe Abb. 3.1). Auch chemisch hergestellte RNAs, welche am 5' bzw. am 3'-Ende eine Monophosphat-Modifikation besaßen, konnten weder in der einzelsträngigen, noch in der doppelsträngigen Version eine Interferon-Antwort auslösen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.1 5'-Triphosphat-RNA induziert Interferonproduktion in humanen Blut-Monozyten**

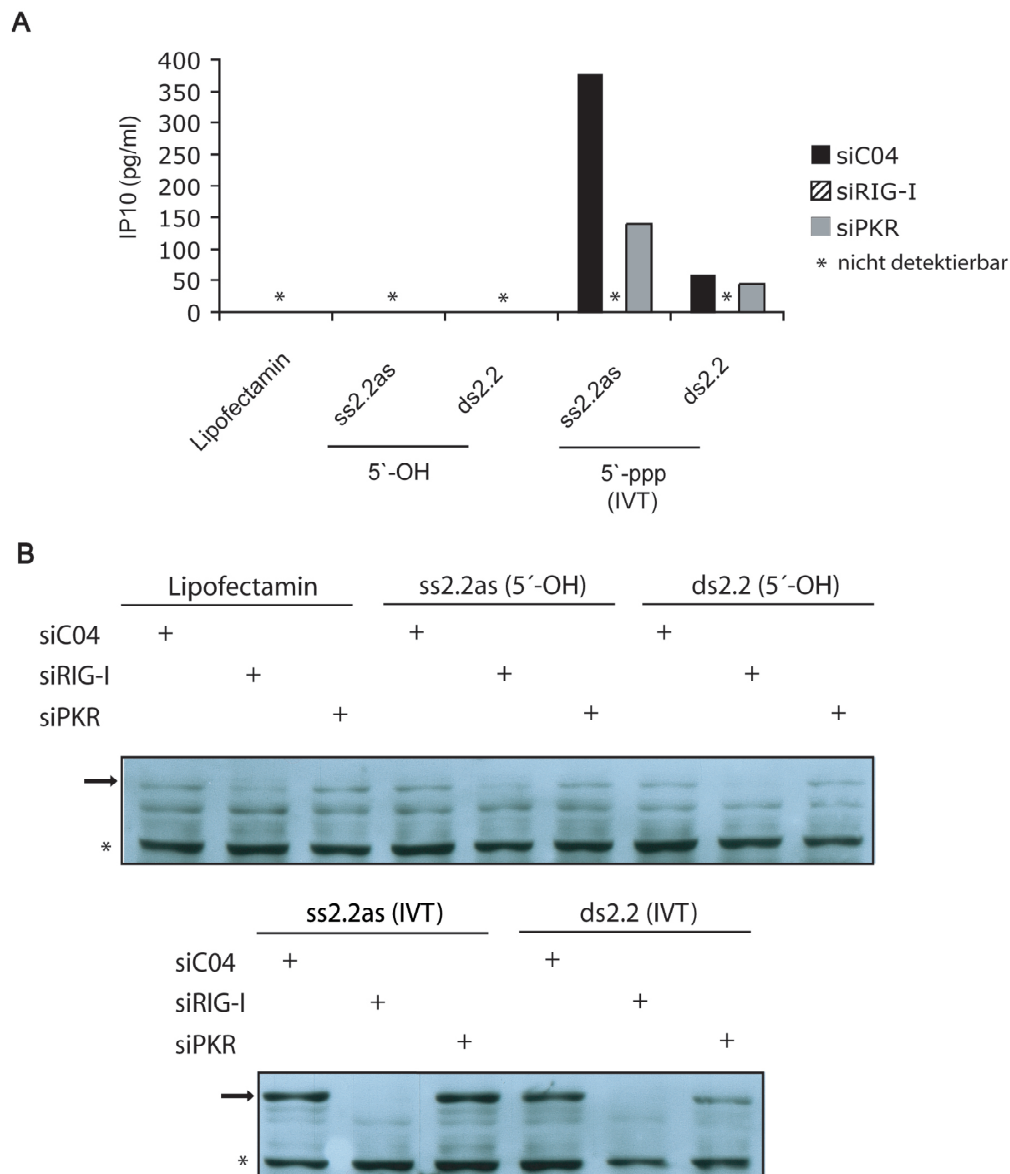
Humane Monozyten wurden mit 1  $\mu$ g/ml synthetischer (5'-OH) bzw. *in vitro* transkribierter (5'-ppp) einzelsträngiger (ss) sowie doppelsträngiger (ds) RNA stimuliert. 36 Stunden später wurde die im Überstand befindliche Interferon- $\alpha$ -Menge mittels ELISA quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte sowie nur mit Transfektionsreagenz (Lipofectamin) stimulierte Zellen. Rechts ist die Sequenz der beiden 2.2-Einzelstränge (ss2.2s: *Sense*-Strang, ss2.2as: *Antisense*-Strang) sowie des Doppelstrangs (ds2.2) angegeben. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung um den Mittelwert eines biologischen Triplikats eines Blutspenders an.

### 3.1.2 Auslösung der Immunantwort durch Triphosphat-RNA ist abhängig von RIG-I

Um zu zeigen, dass die durch *in vitro* transkribierte RNA ausgelöste Immunantwort RIG-I-vermittelt erfolgt, wurden die oben beschriebenen RNAs ebenfalls in der

Melanomzelllinie 1205LU getestet. Vor Stimulation der Zellen wurde RIG-I durch posttranskriptionellen Knockdown mit siRNA herunterreguliert und mit Bedingungen verglichen, in denen eine unspezifische Kontroll-siRNA verwendet wurde. Um zu ermitteln, ob nach Stimulation eine Interferonantwort erfolgt ist, wurde das Protein IP10 (*Interferon gamma-induced protein 10*) im Überstand gemessen, welches selbst Interferon-Typ I-abhängig ausgeschüttet wird. Ähnlich wie im unter 3.1.1 beschriebenen Experiment, führten nur die RNAs zu einer Immunantwort, die über eine 5'-Triphosphat-Modifikation verfügten. Erfolgte vorher jedoch eine Herunterregulation von RIG-I durch siRNA, konnte auch nach Stimulation mit *in vitro* transkribierter RNA kein IP10 im Überstand gemessen werden. Die Verwendung von siRNA gegen PKR (*double-stranded RNA-dependent Protein kinase R*), einem Rezeptor zur Erkennung doppelsträngiger RNA, konnte hingegen die IP10-Ausschüttung nicht unterdrücken (siehe Abb. 3.2 A). Weitere Versuche zeigten, dass die hier beobachtete Reduktion der IP10-Ausschüttung nach Herunterregulation von PKR bei Stimulation mit ss2.2as nicht wiederholt werden konnte und somit kein konsistenter Effekt eines PKR-Knockdown nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Um die Effizienz der gegen RIG-I gerichteten siRNA weiterhin zu beurteilen, wurden nach Abnahme der Überstände für die IP10-Messung die Zellen lysiert und die Lysate im Western Blot auf das Vorhandensein von RIG-I untersucht. In Bedingungen, in denen siRNA gegen RIG-I verwendet wurde, konnte im *Western Blot* keine entsprechende Protein-Bande für RIG-I beobachtet werden. Zudem zeigte sich in Zellen, die mit Triphosphat-RNA stimuliert wurden und zuvor nicht mit siRNA gegen RIG-I behandelt wurden, ein deutlich erhöhtes Expressionslevel von RIG-I (siehe Abb. 3.2 B).



**Abb. 3.2 Die durch 5'-Triphosphat-RNA ausgelöste Immunantwort ist abhängig von RIG-I**

A: Humane Melanomzellen der Linie 1205LU wurden mit siRNAs gegen RIG-I und PKR behandelt und 48 Stunden später mit 1  $\mu$ g/ml der angegebenen RNAs stimuliert. 12 Stunden später wurde die IP10-Menge im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (siC04).

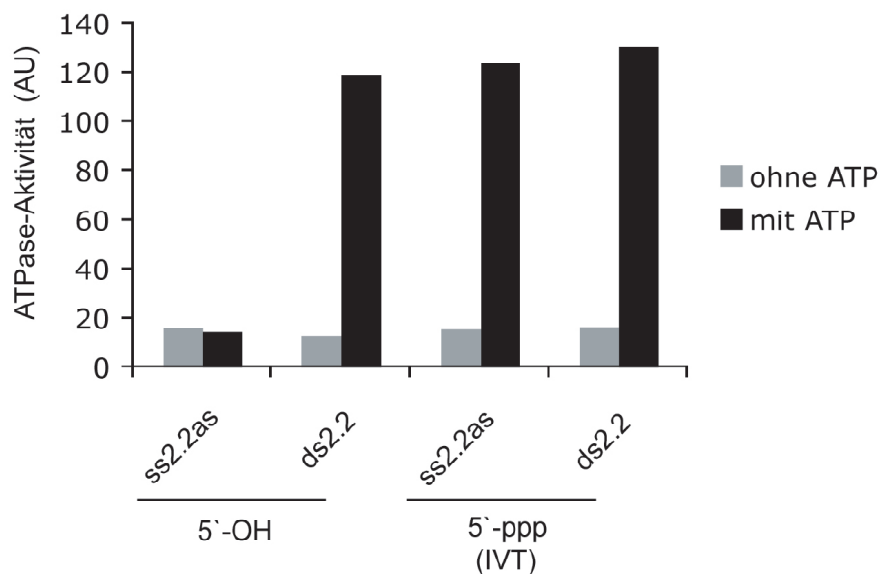
B: Nachweis des RIG-I-*Knockdown* durch Proteinanalyse im Western Blot. Nach Abnahme der Überstände für den IP10-Nachweis wurden die Zellen lysiert und RIG-I mittels Anti-RIG-I-Antikörper im Western Blot nachgewiesen ( $\rightarrow$  = RIG-I; \* = unspezifische Bande).

### 3.1.3 Doppelsträngigkeit oder 5'-Triphosphatmodifikation von RNAs führen zur Induktion der ATPase-Aktivität von RIG-I

Die ATPase-Aktivität der Helikase-Domäne von RIG-I ist eine zwingende Voraussetzung für die Auslösung des RIG-I-vermittelten Signalwegs (Yoneyama et al., 2004). Wie andere DExD/H Box-RNA-Helikasen enthält auch RIG-I eine konservierte Sequenz für die Bindung von ATP, welche als Walker-A-Motiv bezeichnet wird (Walker

et al., 1982). Die Mutation der Aminosäure Lysin innerhalb dieses Motivs führt zum Verlust der ATPase-Aktivität (Rozen et al., 1989; Yoneyama et al., 2004).

Um zu untersuchen, welche RNAs in der Lage sind, die ATPase-Funktion von RIG-I zu aktivieren, wurden diese in einem *in vitro*-Assay mit rekombinantem RIG-I-Protein getestet. Wie zu erwarten, führten die *in vitro* transkribierten RNAs, welche sich bereits als potente Stimulatoren einer RIG-I-vermittelten Immunantwort erwiesen, auch zu einer Induktion der ATPase-Aktivität von RIG-I. Bei den RNAs mit 5'-OH-Modifikation führte jedoch lediglich der Doppelstrang zu einem Umsatz von ATP (siehe Abb. 3.3). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass entweder Doppelsträngigkeit oder eine Triphosphat-Modifikation die Induktion der ATPase-Aktivität von RIG-I auslösen können.



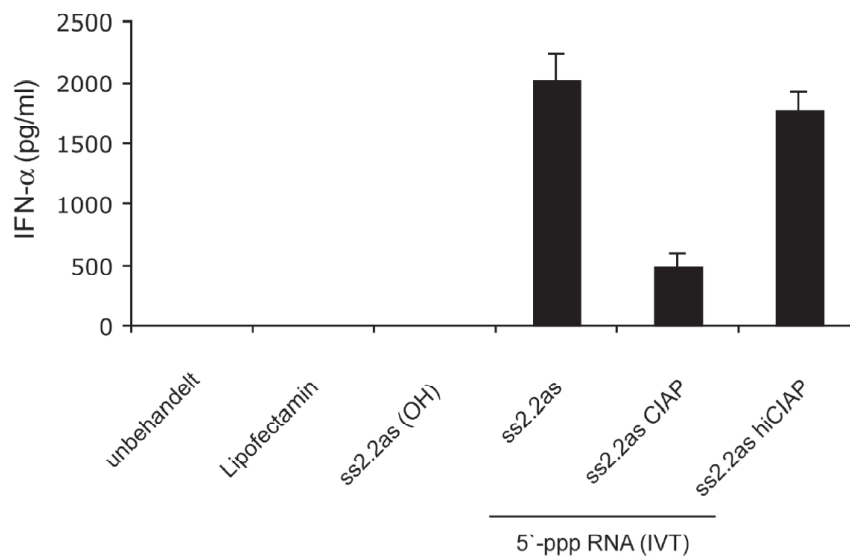
**Abb. 3.3 Doppelsträngige RNAs und RNAs mit 5'-Triphosphatmodifikation induzieren ATPase-Aktivität von RIG-I**

Synthetisch hergestellte (5'-OH) und *in vitro* transkribierte (5'-ppp) einzel-(ss) bzw. doppelsträngige(ds) RNAs wurden für zwei Stunden mit rekombinantem RIG-I-Protein und ATP inkubiert und anschließend der ATP-Umsatz mit dem *ADP Quest Assay* bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Bedingungen ohne ATP-Zugabe. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten (*arbitrary units* = AU) angegeben.

### 3.1.4 Abspaltung des 5'-Triphosphates führt zur Reduktion der Interferonproduktion in humanen Blut-Monozyten

In weiteren Versuchen sollte der bereits von Kim et al. beschriebene Einfluss der 5'-Triphosphat-Modifikation auf die immunstimulatorische Eigenschaft der RNA nachvollzogen werden (Kim et al., 2004). Dafür wurde der *in vitro* transkribierte Einzelstrang (ss2.2as) mit CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) behandelt, was

zu einer Abspaltung der 5'-Triphosphat-Gruppe führt. Humane Blut-Monozyten zeigten nach Transfektion dieser modifizierten RNA eine deutlich reduzierte Interferonantwort im Vergleich zum unbehandelten Einzelstrang. Um Effekte der Phosphatase an sich auszuschließen, erfolgte eine Kontrolle, in der das Enzym vor seiner Anwendung durch Erhitzen inaktiviert wurde (hiCIAP) (siehe Abb. 3.4). Neben dem oben aufgeführten Vergleich von chemisch synthetisierter 5'-OH-RNA mit *in vitro* transkribierter Triphosphat-RNA ist dies ein weiterer Beleg für die Notwendigkeit der 5'-Triphosphat-Modifikation für eine RIG-I-vermittelte Interferonantwort.



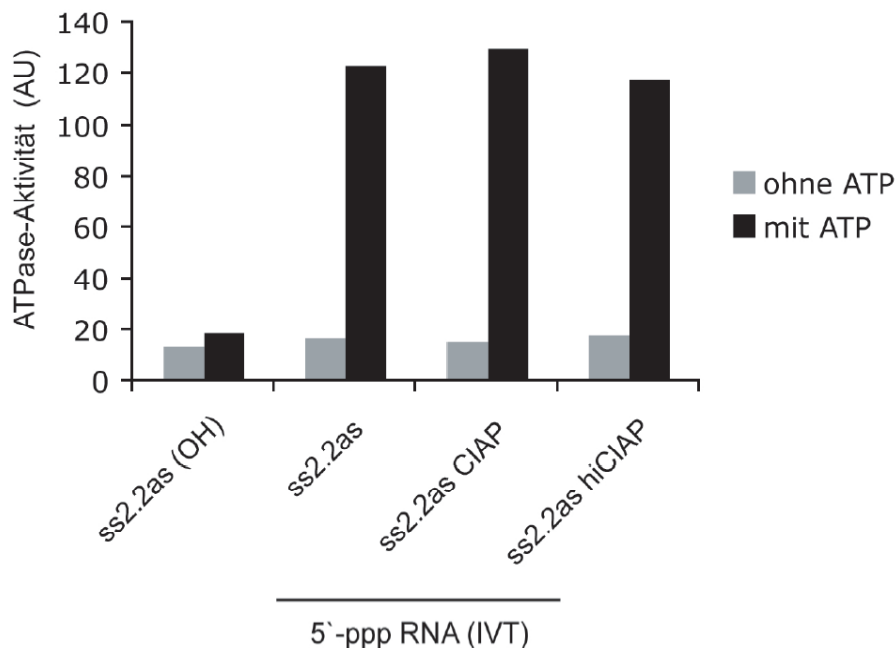
**Abb 3.4 Dephosphorylierung von *in vitro* transkribierter RNA reduziert ihre immunstimulatorische Eigenschaft**

*In vitro* transkribierte einzelsträngige (ss) RNA wurde mit aktiver (CIAP) bzw. Hitze-inaktivierter (hiCIAP) *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* behandelt. 1 µg/ml der RNA wurde in humane Blut-Monozyten transfiziert und nach 36 Stunden die IFN-α-Menge im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte bzw. nur mit Transfektionsreagenz (Lipofectamin) stimulierte Zellen sowie mit synthetischer (5'-OH) RNA transfizierte Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung um den Mittelwert eines biologischen Triplikats eines Blutspenders an.

### 3.1.5 Induktion der ATPase-Aktivität von RIG-I mittels *in vitro* transkribierter RNA ist unabhängig von der 5'-Triphosphatmodifikation

In einem nächsten Schritt wurde die unter 3.1.4 beschriebene dephosphorylierte IVT-RNA (ss2.2as CIAP) auf ihre Fähigkeit untersucht, die ATPase-Aktivität von RIG-I zu induzieren. Dafür wurde diese ebenfalls im oben beschriebenen *in vitro* Assay analysiert (siehe Abb. 3.5). Interessanterweise zeigte sich, dass der dephosphorylierte IVT-Einzelstrang zu einem vergleichbaren ATP-Umsatz führte, wie der unbehandelte sowie der mit inaktivem Enzym behandelte Strang. Dieses Ergebnis war insofern überraschend, da vermutet wurde, dass ein dephosphorylierter IVT-Einzelstrang die

gleichen Eigenschaften haben würde, wie ein chemisch synthetisierter 5'-OH-Einzelstrang der gleichen Sequenz. Zusammenfassend kann aus diesem Versuch gefolgert werden, dass der *in vitro* transkribierte Einzelstrang neben der 5'-Triphosphat-Modifikation eine weitere Eigenschaft besitzen muss, die ihn von der synthetisch hergestellten 5'-OH-RNA unterscheidet und ihn dazu befähigt, die ATP-Hydrolyse durch RIG-I zu aktivieren.



**Abb. 3.5 Dephosphorylierte *in vitro* transkribierte RNA kann die ATP-Hydrolyse durch RIG-I aktivieren**

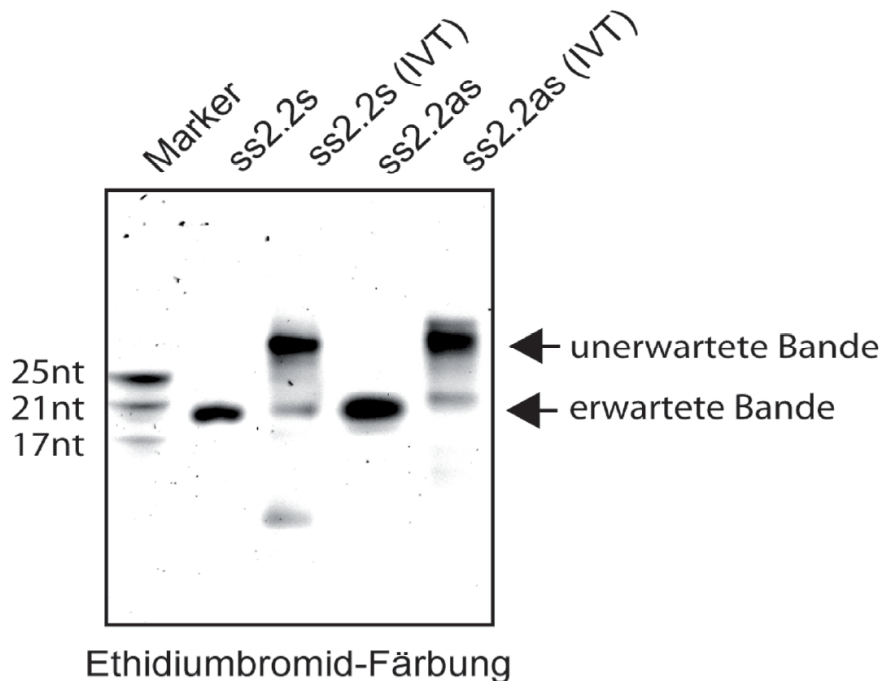
Dephosphorylierte (CIAP) und mit Hitze-inaktivierter Phosphatase (hiCIAP) behandelte *in vitro* transkribierte RNAs wurden für zwei Stunden mit rekombinantem RIG-I-Protein inkubiert und anschließend der ATP-Umsatz bestimmt. Als Negativkontrolle dienten synthetisch hergestellte (5'-OH) RNA sowie Bedingungen ohne ATP-Zugabe.

## 3.2 *In vitro* transkribierte RNA enthält unerwartete Produkte

### 3.2.1 Analyse der IVT-Produkte mittels denaturierender Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Um die aus den oben beschriebenen Versuchen entstandene Frage nach den zusätzlichen Eigenschaften der *in vitro* transkribierten RNA zu beantworten, wurde diese zunächst mittels eines Harnstoff-Polyacrylamidgels näher analysiert. Durch konstant denaturierende Versuchsbedingungen wurde die Bildung von Sekundärstrukturen der zu untersuchenden RNAs verhindert. Somit konnte eine Auftrennung ausschließlich anhand der Länge der jeweiligen RNA erfolgen. Zum

besseren Vergleich wurde neben dem *in vitro* transkribierten *Sense*- und *Antisense*-Strang der entsprechende chemisch synthetisierte 5'-OH-Strang sowie ein Marker aufgetragen (siehe Abb. 3.6). Das Ergebnis zeigt, dass die IVT-RNAs neben einer schwachen Bande auf der erwarteten Höhe eine weitere, deutlich längere Bande enthalten, die das Hauptprodukt der *in vitro*-Transkription darstellt. Dieses Phänomen konnte sowohl beim *Sense*-, als auch beim *Antisense*-Strang beobachtet werden.



**Abb. 3.6 Analyse der *in vitro* transkribierten RNAs zeigt längere Nebenprodukte**

Chemisch synthetisierte (5'-OH) und *in vitro* transkribierte (IVT) 2.2-Einzelstrang-RNA wurde mittels denaturierender Harstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt und nach anschließender Ethidiumbromid-Färbung durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die Pfeile markieren die erwartete bzw. unerwartete RNA-Bande. Als Maßstab wurde ein Marker mit den Größen 17, 21 und 25 Nukleotiden verwendet (aus Schmidt et al., 2009).

### 3.2.2 Unerwartete längere IVT-Produkte sind für die Induktion der Interferonproduktion verantwortlich

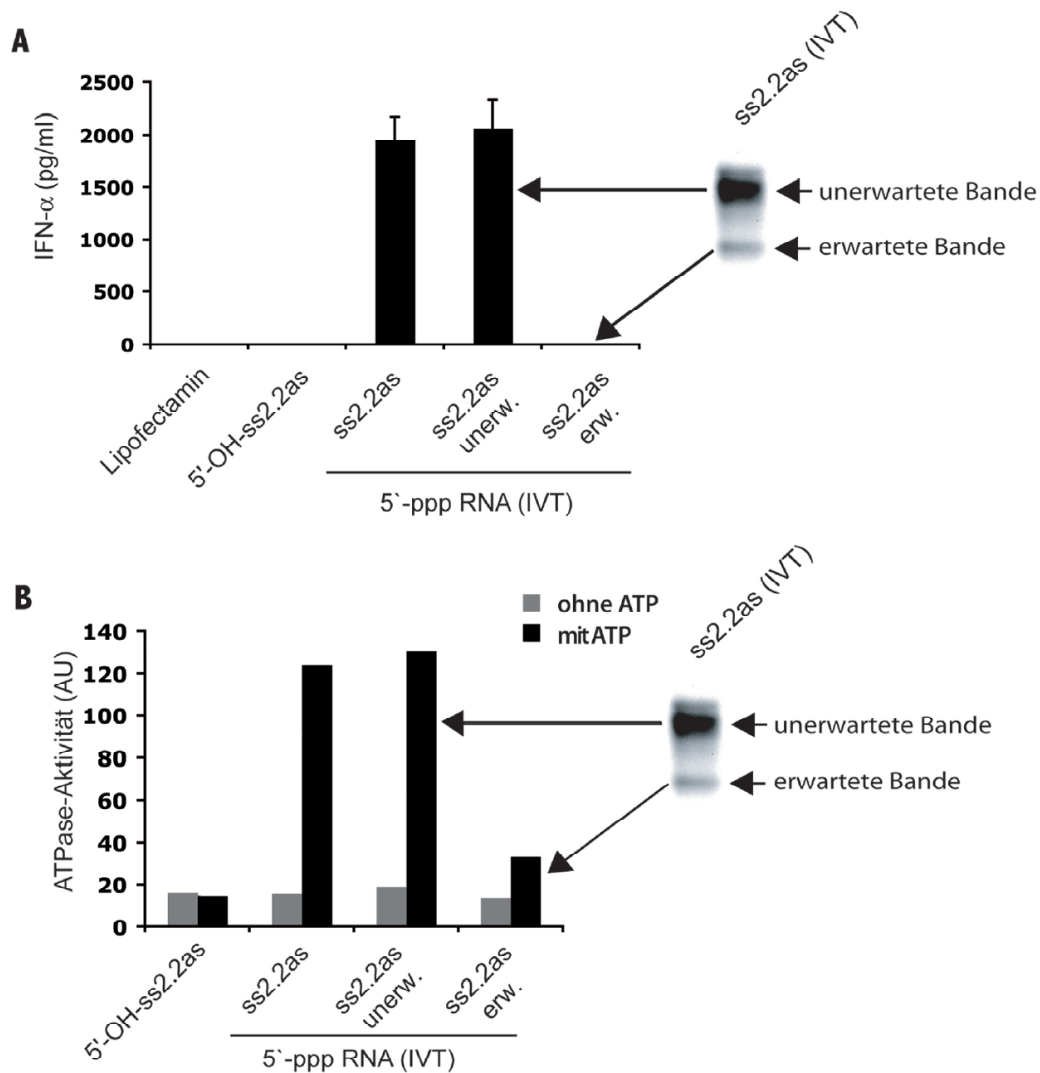
In einem nächsten Schritt sollte analysiert werden, welche Produkte der durch *in vitro* Transkription hergestellten RNAs für das Auslösen einer Interferonantwort in humanen Blut-Monozyten verantwortlich sind. Dafür wurden größere Mengen der IVT-RNA erneut im denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und RNA der unteren erwarteten Bande sowie der oberen unerwarteten Bande re-isoliert. Anschließend erfolgte die Transfektion definierter Mengen der RNA-Re-Isolate in humane Blut-Monozyten mit nachfolgender Interferon- $\alpha$ -Bestimmung im Überstand (Abb. 3.7 A). Es zeigte sich, dass lediglich die unerwarteten längeren IVT-Produkte (ss2.2as unerw.) in

der Lage waren, eine Interferonantwort auszulösen, während die Produkte von erwarteter Größe (ss2.2as erw.) keine immunstimulatorischen Eigenschaften besaßen. Ein ähnliches Ergebnis konnte für den *Sense*-Strang beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.3 Unerwartete IVT-Produkte induzieren die ATPase-Aktivität von RIG-I

Die unter 3.2.2 beschriebenen Re-Isolate der unterschiedlichen IVT-Produkte wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit untersucht, die RIG-I-vermittelte ATP-Hydrolyse zu aktivieren (siehe Abb. 3.7 B). Es zeigte sich, dass lediglich das unerwartete längere IVT-Produkt (ss2.2as unerw.) zu einem relevanten ATP-Umsatz führte. Re-isolierte RNA aus der erwarteten Bande (ss2.2as erw.) konnte hingegen nur eine vergleichsweise schwache Aktivierung der ATPase-Aktivität bewirken. Ähnliche Daten konnten für den *Sense*-Strang erhoben werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die immunstimulatorische Eigenschaft der *in vitro* transkribierten RNAs ausschließlich von längeren Nebenprodukten ausgeht. Die erwartete RNA-Sequenz ist jedoch nicht in der Lage, eine RIG-I-vermittelte Immunantwort auszulösen.





**Abb. 3.7 Unerwartete IVT-Produkte führen zur Interferonproduktion in humanen Blut-Monozyten und induzieren die ATPase-Aktivität von RIG-I**

A: Humane Monozyten wurden mit  $1\mu\text{g/ml}$  von Re-Isolaten der erwarteten bzw. unerwarteten Bande der *in vitro* transkribierten RNA stimuliert und die produzierte Interferonmenge nach 36 Stunden im Überstand gemessen. Als Negativkontrolle diente synthetisch hergestellte RNA (5'-OH), als Positivkontrolle das unbehandelte IVT-Produkt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung um den Mittelwert eines biologischen Triplikats eines Blutspenders an (aus Schmidt et al., 2009).

B: Die unter A beschriebenen Re-Isolate wurden für zwei Stunden mit rekombinantem RIG-I-Protein und ATP inkubiert und anschließend der ATP-Umsatz bestimmt. Als Negativkontrolle dienten synthetisch hergestellte (5'-OH) RNA sowie Bedingungen ohne ATP-Zugabe. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten (arbitrary units = AU) angegeben (aus Schmidt et al., 2009).

### 3.3 Unerwartete IVT-Produkte enthalten Haarnadel-RNA-Strukturen, die in der Lage sind, RIG-I zu aktivieren

Die enzymatische Herstellung von RNA mittels *in vitro*-Transkription ist eine sehr effektive und kostengünstige Methode und wird daher vielfach angewendet. Häufig nutzt man dabei die RNA-Polymerase des Phagen T7, einem Virus, der das

Darmbakterium *Escherichia coli* befällt. Dabei wird mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase-Funktion von einem komplementären DNA-*Template* die gewünschte RNA-Sequenz transkribiert. Die T7-RNA-Polymerase kann jedoch neben ihrer Funktion als DNA-abhängige RNA-Polymerase ebenfalls als RNA-abhängige RNA-Polymerase funktionieren (Cazenave and Uhlenbeck, 1994; Nacheva and Berzal-Herranz, 2003). Enthält die zu transkribierende RNA an ihrem 3'-Ende selbst-komplementäre Basen, kann durch ein Umknicken des 3'-Endes im Sinne einer Haarnadelkurve dieses als *Primer* genutzt werden. In einem zweiten Schritt wird es durch die RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität verlängert und kann somit zur Bildung von nicht-*Template*-kodierten selbstkomplementären Nebenprodukten führen. Dieses als *Copy-back*-Mechanismus bezeichnete Prinzip konnte auch bei anderen viralen Polymerasen während des Replikationszyklus beschrieben werden (Behrens et al., 1996). Da für diesen Mechanismus nur eine geringe Länge an Selbst-Komplementarität notwendig ist, tritt dieses Phänomen sehr häufig bei Anwendung der *in vitro*-Transkriptionstechnik auf (Nacheva and Berzal-Herranz, 2003).

### **3.3.1 Sequenzierung der unerwarteten IVT-Produkte liefert Haarnadel-RNA-Strukturen**

Um zu beweisen, dass die unerwarteten längeren IVT-Produkte selbst-komplementäre Verlängerungen am 3'-Ende enthalten, wurden durch Reverse Transkription der RNA-Re-Isolate cDNAs generiert, kloniert und sequenziert (siehe 2.2.2.4). Während sich bei Re-Isolaten aus der zu erwartenden unteren Bande die gewünschte RNA-Sequenz ergab, erhielt man für die obere Bande deutlich längere RNA-Sequenzen. Nach Eingabe dieser längeren Sequenzen in ein RNA-Struktur-Kalkulations-Programm (Zuker and Stiegler, 1981), konnte man erkennen, dass die zusätzlich transkribierte RNA-Sequenz komplementär zur DNA-*Template*-kodierten Sequenz war. Somit war diese in der Lage, haarnadelförmige Sekundärstrukturen auszubilden. Als repräsentative Beispiele von Re-Isolaten der oberen Bande des IVT-Produkts sind in Abb. 3.8 Klon 1 und Klon 9 dargestellt. Zusätzlich wurde eine vollständige Haarnadel-RNA abgebildet, die als hp2.2s/as bezeichnet ist.

**A**

Klon 1:

5'-GGCAUGCGACCUCUGUUUGA**UCAGAGGU**-3'

Klon 9:

5'-GGCAUGCGACCUCUGUUUGA**GGUCGCAUG**-3'

hp2.2s/as:

5'-GGCAUGCGACCUCUGUUUGAUCAAACAGAGGUCGCAUGCC-3'

**B**

Klon 1



Klon 9



hp2.2s/as

**Abb. 3.8 Sequenzierung und Kalkulation der Sekundärstruktur der unerwarteten IVT-Produkte**

A: Dargestellt sind zwei repräsentative Sequenzen (Klon 1, Klon 9) von Re-Isolaten der unerwarteten RNA-Bande in der Harstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. In rot sind die nicht DNA-Template-kodierten Sequenzen markiert. Weiterhin ist ein vollständiger Haarnadel-Strang (hp2.2s/as) dargestellt.

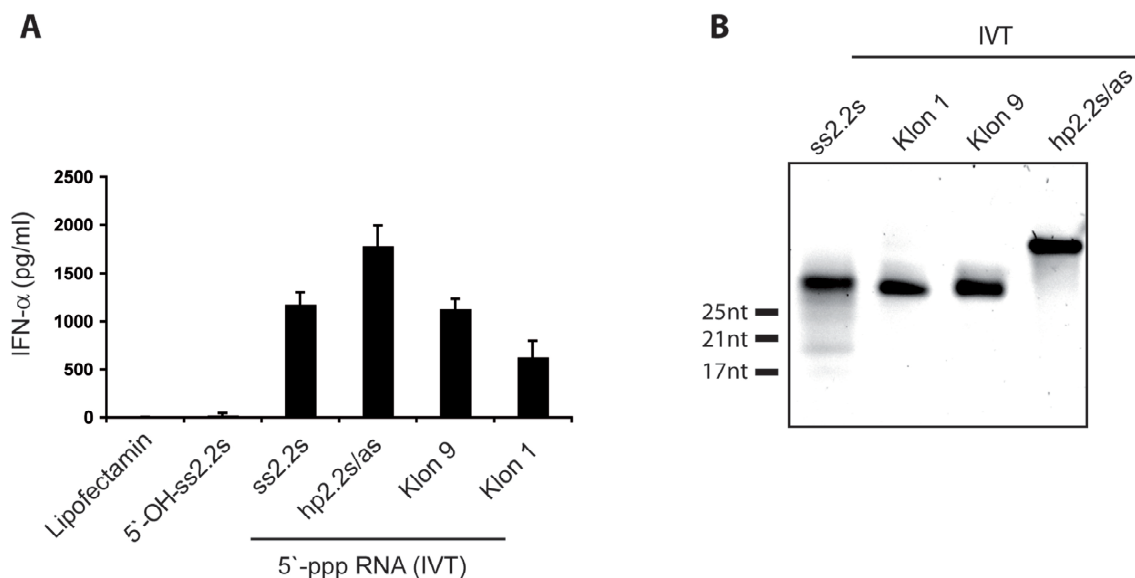
B: Die Sekundärstrukturen von Klon 1, Klon 9 und der vollständigen Haarnadel-RNA hp2.2s/as wurden mit RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) dargestellt. Die nicht DNA-Template-kodierten Sequenzen sind rot markiert (aus Schmidt et al., 2009).

### 3.3.2 *In vitro* transkribierte Haarnadel-RNAs enthalten keine Nebenprodukte und induzieren die Interferonproduktion in humanen Blut-Monozyten

Um zu prüfen, ob die identifizierten Haarnadel-RNAs immunstimulatorische Eigenschaften besitzen, wurden die Sequenzen von Klon 1, Klon 9 und hp2.2s/as *in*

*vitro* transkribiert und auf ihre Fähigkeit untersucht, in humanen Monozyten eine Interferonantwort auszulösen (siehe Abb. 9 A). Dabei stellte sich heraus, dass sowohl die beiden Klone, als auch der gesamte Haarnadelstrang in der Lage waren, eine mit dem ursprünglichen IVT-Produkt (ss2.2s) vergleichbare Interferonmenge zu induzieren. Interessant war, dass die Menge des produzierten IFN- $\alpha$  mit der Länge der Doppelsträngigkeit des entsprechenden Liganden zu korrelieren schien. So erwies sich Klon 1 mit einer Doppelsträngigkeit von 7 Basenpaaren als schwächster, hp2.2s/as mit einer Doppelsträngigkeit von 18 Basenpaaren als stärkster Ligand. Klon 9 lag mit 11 Basenpaaren dazwischen.

Um auszuschließen, dass die immunstimulatorischen Eigenschaften der *in vitro* transkribierten Haarnadel-RNAs erneut durch längere IVT-Produkte bedingt waren, wurden die unter 3.3.2 beschriebenen Sequenzen ebenfalls mittels denaturierender Harstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert. Dabei zeigte sich, dass die IVT-Produkte die erwartete Länge aufwiesen. Zudem enthielten sie keine zusätzlichen Nebenprodukte (siehe Abb. 9 B).



**Abb. 3.9 *In vitro* transkribierte Haarnadel-RNAs induzieren Interferonproduktion in humanen Blut-Monozyten und enthalten keine unerwarteten Nebenprodukte**

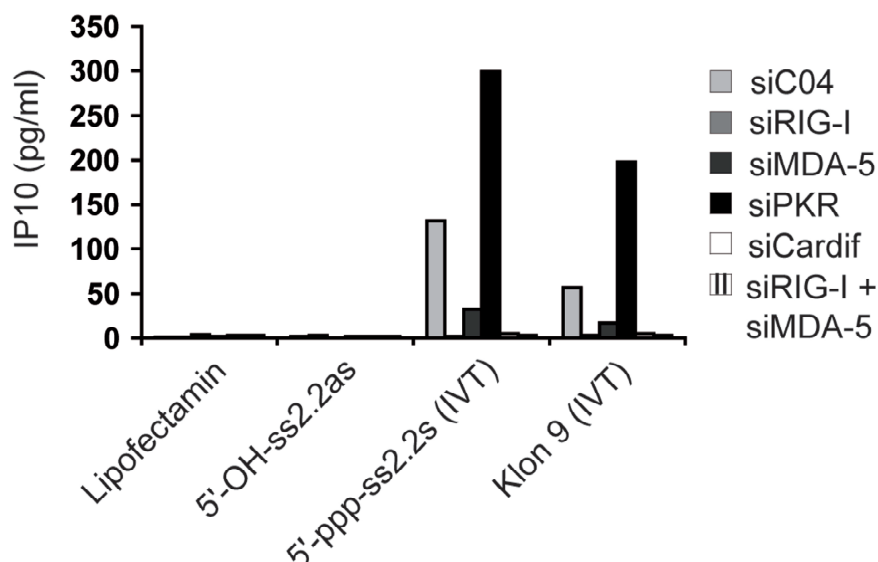
A: Humane Blut-Monozyten wurden mit 1  $\mu$ g/ml *in vitro* transkribierter RNA der Sequenzen Klon 1, Klon 9 und hp2.2s/as stimuliert und nach 36 Stunden die produzierte Interferonmenge im Überstand gemessen. Als Negativkontrolle diente ein synthetisch hergestellter Einzelstrang (5'-OH), als Positivkontrolle das ursprüngliche IVT-Produkt der Sequenz ss2.2s. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung um den Mittelwert eines biologischen Triplikats eines Blutspenders an (aus Schmidt et al., 2009).

B: Die *in vitro* transkribierten RNAs Klon 1, Klon 9 und hp2.2s/as wurden mittels denaturierender Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und anschließender Ethidiumbromid-Färbung im UV-Licht analysiert. Zum Vergleich wurde zusätzlich die IVT-RNA ss2.2s aufgetragen. Als Maßstab diente ein Marker mit 17, 21 und 25 Nukleotiden.

### 3.3.3 Immunstimulatorische Eigenschaft der Haarnadel-RNAs ist abhängig von RIG-I

Um zu zeigen, dass die Erkennung sowie die anschließende Signalweiterleitung nach Stimulation mit 5'-Triphosphat-Haarnadel-RNAs von RIG-I abhängig ist, wurde ein posttranskriptioneller Gen-Knockdown von bestimmten Rezeptoren bzw. Adapterproteinen relevanter Signalwege durchgeführt. Dafür wurden siRNAs gegen RIG-I, MDA-5, PKR und Cardif in der humanen Melanomzelllinie 1205LU verwendet. Im Überstand gemessenes IP-10 als Interferon-induzierbares Zytokin diente als Indikator für die immunstimulatorische Kompetenz eines Liganden (siehe Abb. 10).

Bei den Bedingungen, in denen RIG-I, das Adapterprotein Cardif oder RIG-I und MDA-5 gemeinsam ausgeknockt wurden, erfolgte nach Stimulation mit den entsprechenden Haarnadel-RNAs eine nahezu vollständige Reduktion der IP-10-Produktion im Vergleich zu einer unspezifischen Kontroll-siRNA (siC04). Beim alleinigen *Knockdown* von MDA-5 erfolgte zwar eine deutliche Reduktion der IP-10-Antwort, jedoch blieb eine signifikante Restmenge des Zytokins erhalten. Dies deutet darauf hin, dass MDA-5 bei der Ausbildung einer vollständigen Immunantwort beteiligt sein könnte, das Protein an sich dafür jedoch nicht essentiell ist. Interessanterweise konnte nach *Knockdown* von PKR ein Anstieg der IP-10-Menge im Vergleich zur Kontroll-siRNA beobachtet werden.



**Abb. 3.10 Immunstimulatorische Eigenschaft der Haarnadel-RNAs ist abhängig von RIG-I und Cardif**

Humane Melanomzellen der Linie 1205LU wurden mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und 48 Stunden später mit 1 µg/ml der angegebenen Liganden stimuliert. 12 Stunden später wurde die IP10-Menge im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische siRNA (siC04) verwendet (aus Schmidt et al., 2009).

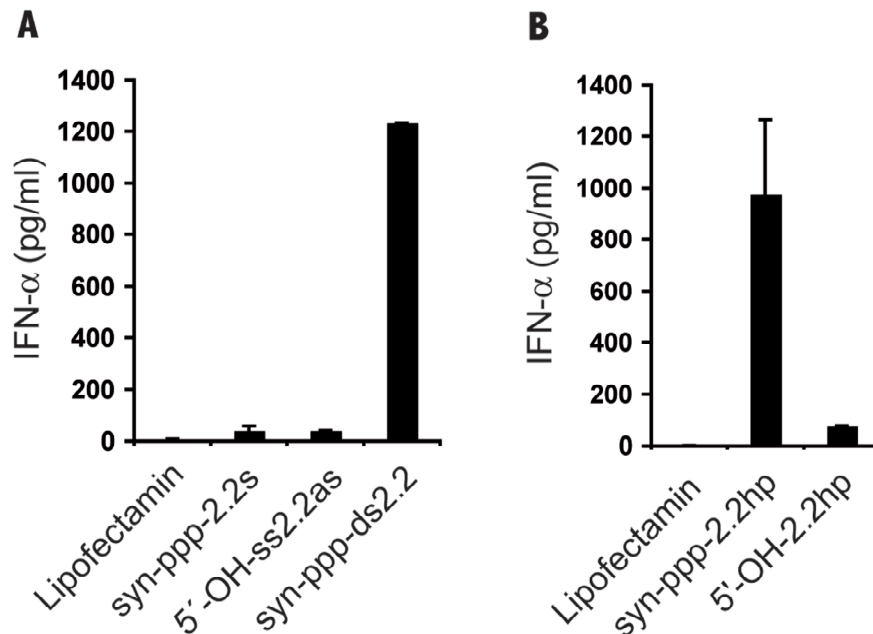
### **3.4 Doppelsträngigkeit neben 5'-Triphosphatmodifikation als weitere Voraussetzung für die Auslösung einer Interferonantwort via RIG-I**

#### **3.4.1 5'-Triphosphatmodifikation alleine ist nicht ausreichend für die Aktivierung von RIG-I**

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob ein RNA-Einzelstrang mit 5'-Triphosphatmodifikation, der nicht in der Lage ist, stabile Sekundärstrukturen auszubilden, zur Aktivierung einer RIG-I-vermittelten Interferonantwort führen kann. Dafür wurde chemisch synthetisierte Triphosphat-RNA (syn-ppp-2.2s) verwendet, deren Herstellung von chemischer Seite technisch schwierig und aufwändig ist und welche in bis zum damaligen Zeitpunkt veröffentlichten Publikationen daher noch nicht eingesetzt worden war.

Es zeigte sich, dass synthetische Triphosphat-RNA als Einzelstrang nicht in der Lage ist, nach Transfektion in humane Monozyten eine Interferonantwort auszulösen (siehe Abb. 3.11 A). Wurde die Triphosphat-RNA zuvor jedoch mit einem komplementären Gegenstrang mit 5'-OH-Ende hybridisiert (syn-ppp-ds2.2), erfolgte eine starke Interferonantwort. Zudem wurde eine synthetisch hergestellte Haarnadel-RNA mit 5'-Triphosphatmodifikation (syn-ppp-2.2hp) getestet und mit einer Haarnadel-RNA mit 5'-OH-Modifikation verglichen (siehe Abb. 3.11 B). Wie zu erwarten, war nur die RNA immunstimulatorisch aktiv, die eine 5'-Triphosphatmodifikation besaß.

Dieses Ergebnis belegt, dass die 5'-Triphosphatmodifikation notwendig, jedoch nicht ausreichend für das Auslösen einer RIG-I vermittelten Immunantwort ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass beide Eigenschaften, 5'-Triphosphatmodifikation und Doppelsträngigkeit gemeinsam, das von RIG-I erkannte Muster darstellen. Dabei spielt es jedoch keine Rolle, ob beide Eigenschaften wie bei der Haarnadel-RNA innerhalb eines Moleküls vereint sind, oder die Doppelsträngigkeit durch Hybridisierung eines komplementären Stranges erfolgt.



**Abb. 3.11 Synthetisch hergestellte Triphosphat-RNA kann als Doppelstrang oder Haarnadel-RNA eine Interferonantwort in Monozyten auslösen**

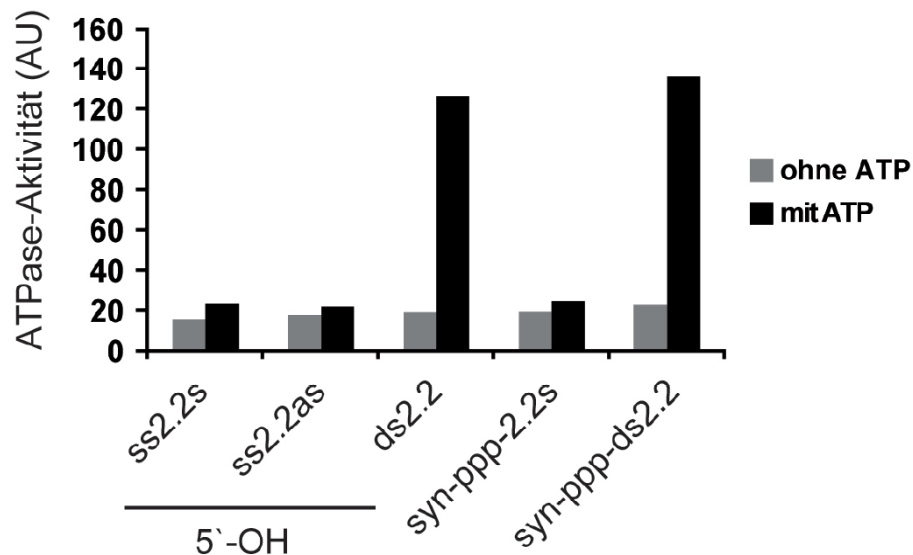
A: Chemisch synthetisierte einzelsträngige 5'-Triphosphat-RNA (syn-ppp-2.2s) wurde alleine sowie nach Hybridisierung mit einem komplementären Gegenstrang mit 5'-OH-Ende (syn-ppp-ds2.2) in humane Monozyten transfiziert. 36 Stunden später wurde die Interferon- $\alpha$ -Sekretion im Überstand mittels ELISA quantifiziert.

B: Chemisch synthetisierte Haarnadel-RNA mit 5'-Triphosphat- (syn-ppp-2.2hp) bzw. 5'-OH-Modifikation (5'-OH-2.2hp) wurde ebenfalls in Monozyten transfiziert und nach 36 Stunden die Interferon- $\alpha$ -Menge im Überstand quantifiziert.

Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung um den Mittelwert eines biologischen Triplikats eines Blutspenders an (aus Schmidt et al., 2009).

### 3.4.2 Doppelsträngigkeit der RNA ist ausreichendes Kriterium für die Induktion der ATPase-Aktivität von RIG-I

Die chemisch synthetisierte einzelsträngige Triphosphat-RNA (syn-ppp-2.2s) wurde ebenfalls auf ihre Fähigkeit analysiert, die ATP-Hydrolyse via RIG-I zu triggern (siehe Abb. 12). Wie bereits vermutet, war sie als Einzelstrang nicht in der Lage, die ATPase-Aktivität auszulösen. Erst nach Hybridisieren mit einem komplementären Gegenstrang erfolgte eine ATP-Hydrolyse. Da die ATPase-Aktivität durch einen Triphosphat-Doppelstrang im Vergleich zu einem OH-Doppelstrang nicht signifikant stärker ausgelöst werden kann, ist dies ein Hinweis darauf, dass für die Aktivierung der ATP-Hydrolyse durch RIG-I die 5'-Triphosphatmodifikation der RNA nicht ausschlaggebend ist.



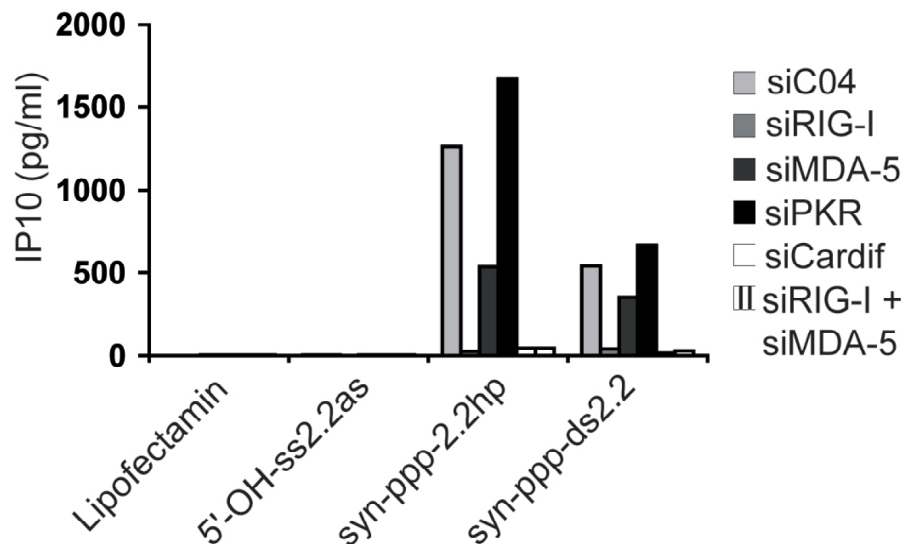
**Abb. 3.12 Doppelsträngigkeit der RNA ist notwendig und ausreichend für die Induktion der ATPase-Aktivität von RIG-I**

Synthetisch hergestellte einzel- bzw. doppelsträngige RNAs mit 5-Hydroxy(5'-OH)- bzw. Triphosphatmodifikation (syn-ppp) wurden für zwei Stunden mit rekombinantem RIG-I-Protein inkubiert und anschließend der ATP-Umsatz bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Bedingungen ohne ATP-Zugabe. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten (arbitrary units = AU) angegeben (aus Schmidt et al., 2009).

### 3.4.3 Durch synthetische Triphosphat-RNA ausgelöste Immunantwort ist abhängig von RIG-I

Um zu zeigen, dass die beobachteten Effekte mit der synthetischen Triphosphat-RNA ebenfalls RIG-I-abhängig waren, wurde erneut ein posttranskriptioneller Genknockdown mittels siRNA in der humanen Melanomzelllinie 1205LU durchgeführt (siehe Abb. 13). Dabei wurden die unter 3.3.3 beschriebenen siRNAs verwendet. Wie erwartet, zeigte sich eine komplette Abhängigkeit von RIG-I sowie dem Adapterprotein Cardif, jedoch nur eine partielle Abhängigkeit von MDA-5.





**Abb. 3.13 Immunantwort durch synthetisch erzeugte Triphosphat-RNA ist abhängig von RIG-I und Cardif**

Humane Melanomzellen der Linie 1205LU wurden mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und 48 Stunden später mit 1 µg/ml der angegebenen RNAs stimuliert. 12 Stunden später wurde die IP10-Menge im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische siRNA (siC04) verwendet (aus Schmidt et al., 2009).

### 3.4.4 Einfluss der Länge der Doppelsträngigkeit auf Interferonproduktion und ATPase-Aktivität

Die bisherigen Ergebnisse zeigten klar, dass die 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA alleine nicht ausreichend war, um eine RIG-I-vermittelte Immunantwort auszulösen. Doppelsträngigkeit war als weiteres Kriterium notwendig. Um dieses zusätzliche Kriterium genauer zu analysieren, wurden unterschiedliche Längen des Gegenstrangs vom 5'- bzw. vom 3'-Ende an den synthetischen Triphosphat-Einzelstrang hybridisiert.

#### 3.4.4.1 Minimale Doppelsträngigkeit für die Aktivierung der Interferonproduktion ist abhängig von der Entfernung zur 5'-Triphosphat-Modifikation

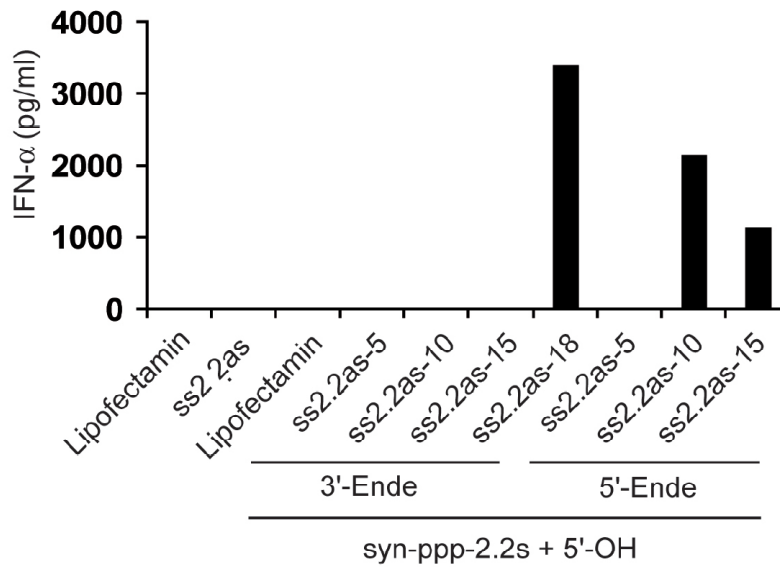
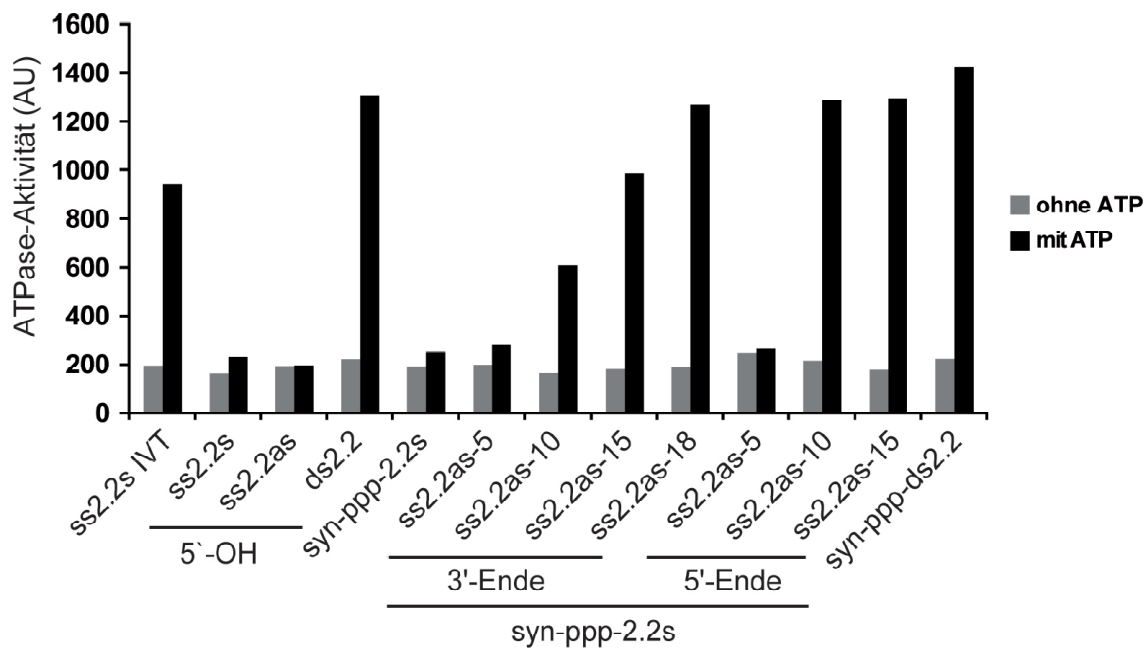
Wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 5, 10 bzw. 15 Nukleotiden ausgehend vom 3'-Ende der synthetischen Triphosphat-Einzelstrang-RNA hybridisiert, konnte nach Transfektion in humane Monozyten keine Interferonantwort ausgelöst werden. Erst ein 18 Nukleotide langer Doppelstrang führte zu einer deutlichen Interferonproduktion (siehe Abb. 14 A). Erfolgte die Hybridisierung dagegen vom 5'-Ende beginnend, war eine Doppelsträngigkeit von 10 Nukleotiden bereits ausreichend, um eine Immunantwort auszulösen (siehe Abb. 14 A).

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass nicht nur eine bestimmte Mindestlänge an Doppelsträngigkeit vorliegen muss, sondern dass auch die Entfernung zur Triphosphat-Modifikation eine wesentliche Rolle spielt.

#### 3.4.4.2 Aktivierung der ATPase-Aktivität von RIG-I korreliert mit der Länge der Doppelsträngigkeit unabhängig von der 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA

Die oben beschriebenen RNA-Konstrukte wurden weiterhin auf ihre Fähigkeit untersucht, die RIG-I-vermittelte ATP-Hydrolyse zu aktivieren. Dabei zeigte sich, dass eine Doppelsträngigkeit von mindestens 10 Basenpaaren vorliegen muss, um die ATPase-Aktivität von RIG-I auszulösen. Die relative Entfernung zum 5'- oder 3'-Ende war dabei nicht entscheidend. Dieses Ergebnis legt nahe, dass, obwohl die ATP-Hydrolyse für eine Signaltransduktion via RIG-I essentiell ist, keine einfache Korrelation zwischen ATPase-Aktivität und Induktion einer Interferonantwort besteht.

In weiteren Versuchen konnte zudem gezeigt werden, dass nach Hybridisierung von längeren Gegensträngen, die über das 5'-Ende der synthetischen Triphosphat-RNA hinausgingen, diese zwar noch in der Lage waren, ATPase-Aktivität auszulösen, nicht jedoch eine Interferonproduktion in Monozyten zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis untermauert die Wichtigkeit einer freiliegenden 5'-Triphosphat-Gruppe der RNA für die Interaktion mit RIG-I.

**A****B**

**Abb. 3.14 Einfluss der Länge der Doppelsträngigkeit sowie der Entfernung zur 5'-Triphosphatmodifikation auf Induktion einer Interferonantwort und Aktivierung der ATPase-Aktivität von RIG-I**

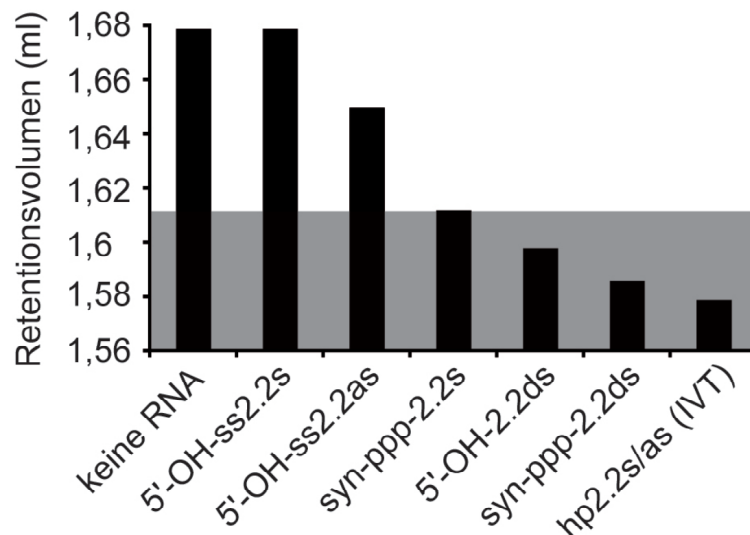
A: Synthetische 5'-Triphosphat-RNA (syn-ppp-2.2s) wurde mit synthetischen 5'-OH-Oligonukleotiden verschiedener Länge vom 5'-Ende bzw. vom 3'-Ende ausgehend hybridisiert. Humane Monozyten wurden mit jeweils 1 µg/ml der angegebenen RNA-Konstrukte stimuliert und die Interferonmenge nach 36 Stunden im Überstand gemessen (aus Schmidt et al., 2009).

B: Die unter A angegebenen RNA-Konstrukte wurden für zwei Stunden mit rekombinantem RIG-I-Protein inkubiert und anschließend der ATP-Umsatz bestimmt. Als Negativkontrolle dienen Bindungen ohne ATP-Zugabe. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten (arbitrary units = AU) angegeben (aus Schmidt et al., 2009).

### **3.5 Sowohl die 5'-Triphosphat-Modifikation, als auch die Doppelsträngigkeit von RNA tragen zur Homodimerisierung von RIG-I bei**

Im Jahr 2008 konnten Cui et al. zeigen, dass die Dimerisierung zweier RIG-I-Moleküle als essentieller Schritt in der Aktivierung von RIG-I sowie der nachfolgenden Signalweiterleitung notwendig ist (Cui et al., 2008). In einem weiteren Versuch sollte daher der Einfluss der beiden für eine RIG-vermittelte Immunantwort erforderlichen RNA-Strukturmerkmale, 5'-Triphosphatmodifikation und Doppelsträngigkeit, auf die Homodimerisierung von RIG-I *in vitro* analysiert werden. Aufgereinigtes Volllängen-RIG-I-Protein wurde dafür mit unterschiedlichen RNA-Liganden inkubiert und die RIG-I-Dimerisierung mittels Gel-Filtrations-Analyse untersucht. Bei dieser Methode durchlaufen größere Proteinkomplexe die Matrix der verwendeten Filtrationssäulen deutlich schneller, während kleinere Moleküle durch das Eindringen in feinere Poren der Säulenmatrix mehr Zeit sowie ein höheres Elutionsvolumen benötigen.

Wie zu erwarten hatte die Inkubation von RIG-I mit Einzelstrang-RNA mit 5'-OH-Modifikation (5'-OH-ss2.2s) keinen Einfluss auf die Menge des benötigten Elutionsvolumens verglichen mit einer Kontrolle ohne RNA. Wurde RIG-I jedoch mit synthetischer Triphosphat-RNA oder doppelsträngiger 5'-OH-RNA inkubiert, konnte jeweils eine deutliche Reduktion des benötigten Elutionsvolumens beobachtet werden, was auf Protein-Dimerisierung hinwies. Bei Verwendung von Liganden, welche sowohl doppelsträngig waren, als auch über eine 5'-Triphosphatmodifikation verfügten (syn-ppp-2.2ds, hp2.2s/as IVT), zeigte sich eine deutlich stärkere Reduktion des benötigten Elutionsvolumens (siehe Abb. 3.15). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Strukturmerkmale der RNA unabhängig voneinander die Konformation von RIG-I beeinflussen und somit zu dessen Dimerisierung beitragen. Weiterhin lassen die Ergebnisse vermuten, dass das gleichzeitige Vorhandensein beider RNA-Strukturmerkmale eine andere Konformationsänderung bewirkt, als das alleinige Vorhandensein nur eines Merkmals. Dieser Unterschied könnte möglicherweise ausschlaggebend für die Formation eines funktionierenden Signaltransduktionskomplexes sein.



**Abb. 3.15 Beide Erkennungsmuster, 5'-Triphosphat-Modifikation und Doppelsträngigkeit, führen zur Homodimerisierung von RIG-I**

Die angegebenen RNA-Konstrukte wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Homodimerisierung von rekombinantem RIG-I-Volllängenprotein zu induzieren. Dafür wurde das Protein-RNA-Gemisch auf Gel-Filtrations-Säulen gegeben und die Absorption des Eluats mit UV-Licht der Wellenlänge 280 nm gemessen. Die Balken Stellen die Maxima der jeweiligen RIG-I-Elutionsvolumina dar. Die graue Fläche stellt den Wertebereich dar, für den eine RIG-I-Homodimerisierung durch RNA-Bindung angenommen werden kann. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Cui der AG Hopfner im Genzentrum (München, D) durchgeführt (aus Schmidt et al., 2009).

### 3.6 Bindung von doppelsträngiger 5'-Triphosphat-RNA an RIG-I erfolgt über unterschiedliche Bindungsstellen

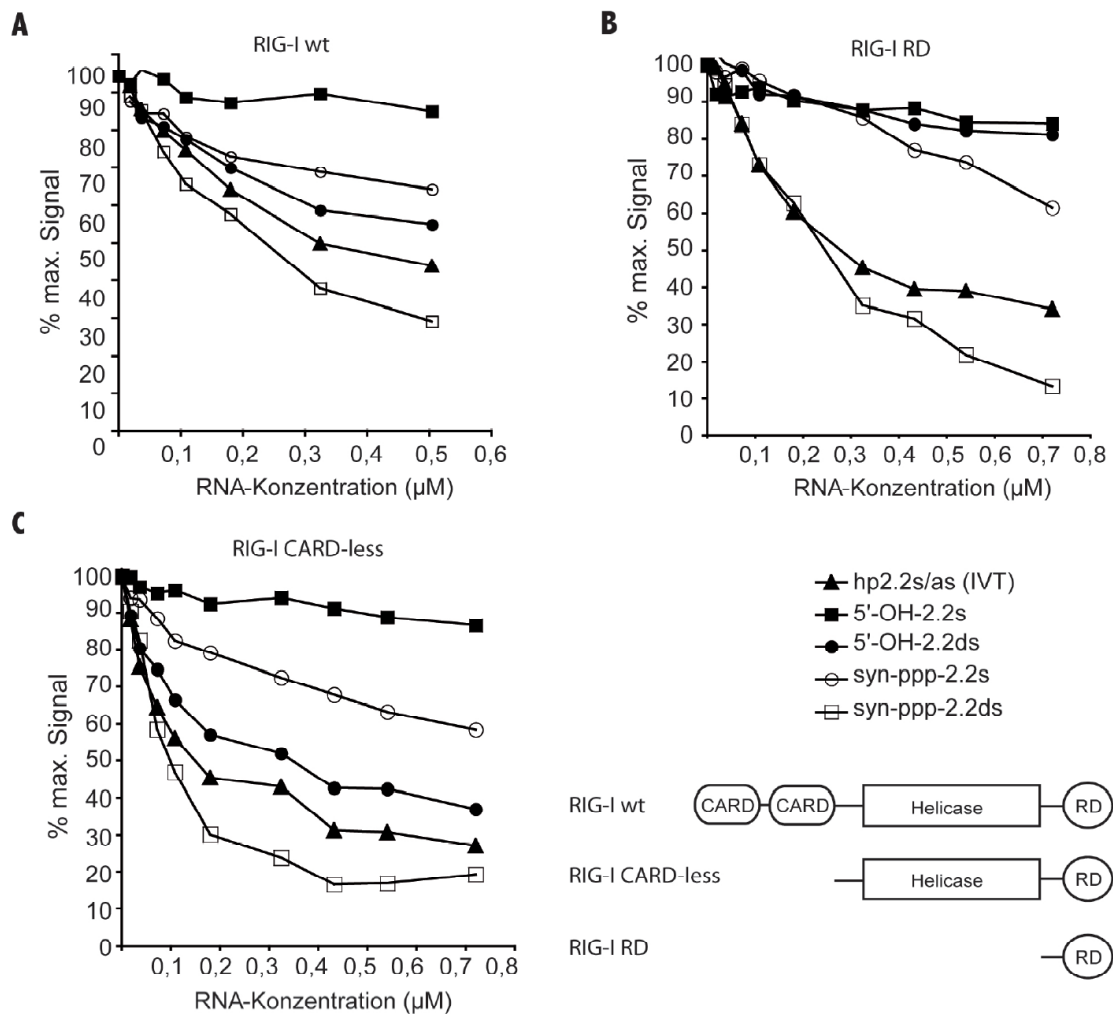
Eine zentrale Frage für das Verständnis einer RIG-I-vermittelten Immunantwort ist der Einfluss der beschriebenen Strukturmerkmale der RNA auf die Bindung an die unterschiedlichen Proteindomänen. In einigen Studien wurde bereits über die Bindung doppelsträngiger RNA (Yoneyama et al., 2004) sowie von Triphosphat-RNA (Hornung et al., 2006) an RIG-I berichtet. Im Jahr 2008 konnte die Struktur der C-terminalen Domäne (CTD) von RIG-I mittels Röntgenkristallographie sowie Magnetresonanzbildgebung entschlüsselt werden. Dabei fand man eine Bindestelle für doppelsträngige RNA und 5'-Triphosphat-RNA in der Regulatorischen Domäne (Cui et al., 2008; Takahasi et al., 2008).

Um genauer zu untersuchen, wie die beiden Merkmale, Doppelsträngigkeit und 5'-Triphosphatmodifikation, zur RIG-I-vermittelten RNA-Erkennung beitragen, wurde ein kompetitiver Bindungs-Assay verwendet, welcher auf dem Prinzip der Fluoreszenzanisotropie beruht. Zu verschiedenen aufgereinigten RIG-I-Proteinkonstrukten, welche bereits an eine fluoreszenz-markierte RNA (IVT hp2.2s-as)

gebunden waren, wurden sukzessive synthetische Liganden hinzugefügt, welche nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren. Zur Quantifizierung der Ligandenbindung an das jeweilige Protein wurde die Abnahme des Anisotropiesignals bestimmt. Wie zu erwarten, erfolgte bei der einzelsträngigen RNA mit einer 5'-OH-Modifikation keine Reduktion des Anisotropiesignals beim Volllängen-Protein. Bei RNAs, die hingegen eine 5'-Triphosphat-Modifikation, Doppelsträngigkeit oder beide Eigenschaften besaßen, konnte ein deutlicher Abfall der Fluoreszenzanisotropie beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass diese Liganden in der Lage sind, die IVT hp2.2s-as RNA aus der Bindungsstelle von RIG-I zu verdrängen (siehe Abb. 16A). Dabei konnte ein größerer Abfall des Anisotropiesignals beobachtet werden, wenn beide Erkennungsmerkmale vorlagen (syn-ppp-ds2.2, IVT hp2.2s-as).

Die gleichen Liganden wurden in einem weiteren Versuch mit der Regulatorischen Domäne von RIG-I (RIG-I RD) getestet (siehe Abb. 16B). Wie in dem Versuch mit Volllängen-RIG-I zeigte sich, dass Liganden, die neben der 5'-Triphosphat-Modifikation auch doppelsträngig waren, eine stärkere Bindung aufwiesen als Liganden, die nur über eine 5'-Triphosphat-Modifikation verfügten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass auch Doppelsträngigkeit neben der 5'-Triphosphat-Modifikation Einfluss auf die Ligandenbindung durch die Regulatorische Domäne (RD) hat. Die doppelsträngige RNA ohne Triphosphat-Modifikation war jedoch nicht in der Lage, die fluoreszenzgekoppelte IVT hp2.2s-as RNA zu verdrängen, was vermuten lässt, dass es sich bei Doppelsträngigkeit um ein nachrangiges Binde-Kriterium durch die RD handelt. Bei der Verwendung von Volllängen-RIG-I sowie einem Proteinkonstrukt, das lediglich aus der Helikase-Domäne und der Regulatorischen Domäne bestand (siehe Abb. 16C), wies jedoch der Doppelstrang mit OH-Modifikation eine bessere Bindung auf als der Einzelstrang mit 5'-Triphosphat-Modifikation.

Vergleicht man schließlich die Bindungsergebnisse dieser drei unterschiedlichen Proteinkonstrukte, kann man schließen, dass die Helikase-Domäne eine starke Bindung zum doppelsträngigen Anteil der RNA aufweist. Für die Bindung an die RD ist die 5'-Triphosphat-Modifikation ausschlaggebend, die Doppelsträngigkeit scheint hier lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen.



**Abb. 3.16 RNA-Bindung an RIG-I erfolgt über unterschiedliche Bindungsstellen**

Rekombinantes RIG-I-Volllängenprotein (RIG-I wt; A), die RIG-RD-Domäne (RIG-I RD; B) bzw. RIG-I-Protein ohne CARD-Domänen (RIG-I CARD-less; C) wurden jeweils mit fluoreszenz-markierter RNA (5'-ppp-hp2.2s/as) vorinkubiert. Danach wurde sukzessive nicht-markierte Kompetitor-RNA zugegeben und die Abnahme des Fluoreszenz-Anisotropiesignals bestimmt, welche mit der Bindungsfähigkeit der RNA-Liganden an RIG-I korreliert. Der Ausgangswert des Anisotropie-Signals wurde nach Equilibrierung der fluoreszenz-markierten RNA mit dem jeweiligen Protein-Konstrukt ohne Zugabe von Kompetitor-RNA ermittelt und als 100% definiert. Rechts unten ist eine schematische Darstellung der verwendeten Protein-Konstrukte abgebildet (aus Schmidt et al., 2009).

### 3.7 Virale *Leader*-RNAs besitzen beide Erkennungsmerkmale, die zur Aktivierung von RIG-I führen

In einigen Studien wurden bereits bestimmte virale RNAs nach Infektion als Liganden von RIG-I beschrieben (Plumet et al., 2007; Samanta et al., 2006). Dabei handelt es sich unter anderem um kurze RNAs, welche bei einer Infektion mit Epstein-Barr Virus vorkommen (EBER, Epstein-Barr virus-encoded RNAs). Aber auch *Leader*-RNAs von Einzel(-)-Strang RNA-Viren werden durch RIG-I erkannt (Plumet et al., 2007). *Leader*-RNAs sind RNA-Transkripte von etwa 50 Nukleotiden Länge, welche bei Einzel(-)-

Strang RNA-Viren als erstes vom 3'-Ende des viralen Genoms erzeugt werden. Ihr 5'-Ende hat kein *Cap*, sie besitzen keinen Poly-A-Schwanz und dienen nicht zur Translation (Plumet et al., 2007).

Um zu überprüfen, ob das durch die vorherigen Versuche ermittelte zweite wesentliche Kriterium des RIG-I-Liganden, die Doppelsträngigkeit, bei *Leader*-RNAs von Einzel(-)-Strang RNA-Viren vorhanden ist, wurden die Sekundärstrukturen der Sequenzen von Sendai-, Masern- und Rabiesvirus-*Leader*-RNA durch ein RNA-Struktur-Kalkulations-Programm (Zuker and Stiegler, 1981) ermittelt (siehe Abb. 3.17 E). Dabei zeigte sich, dass jede der untersuchten RNA-Sequenzen in der Lage ist, stabile Haarnadelstrukturen auszubilden, was zur Formierung von doppelsträngigen Stammstrukturen nahe der 5'-Triphosphat-Modifikation führt.

### **3.7.1 Sendai-Virus-*Leader*-RNA führt zur RIG-I vermittelten Interferonproduktion**

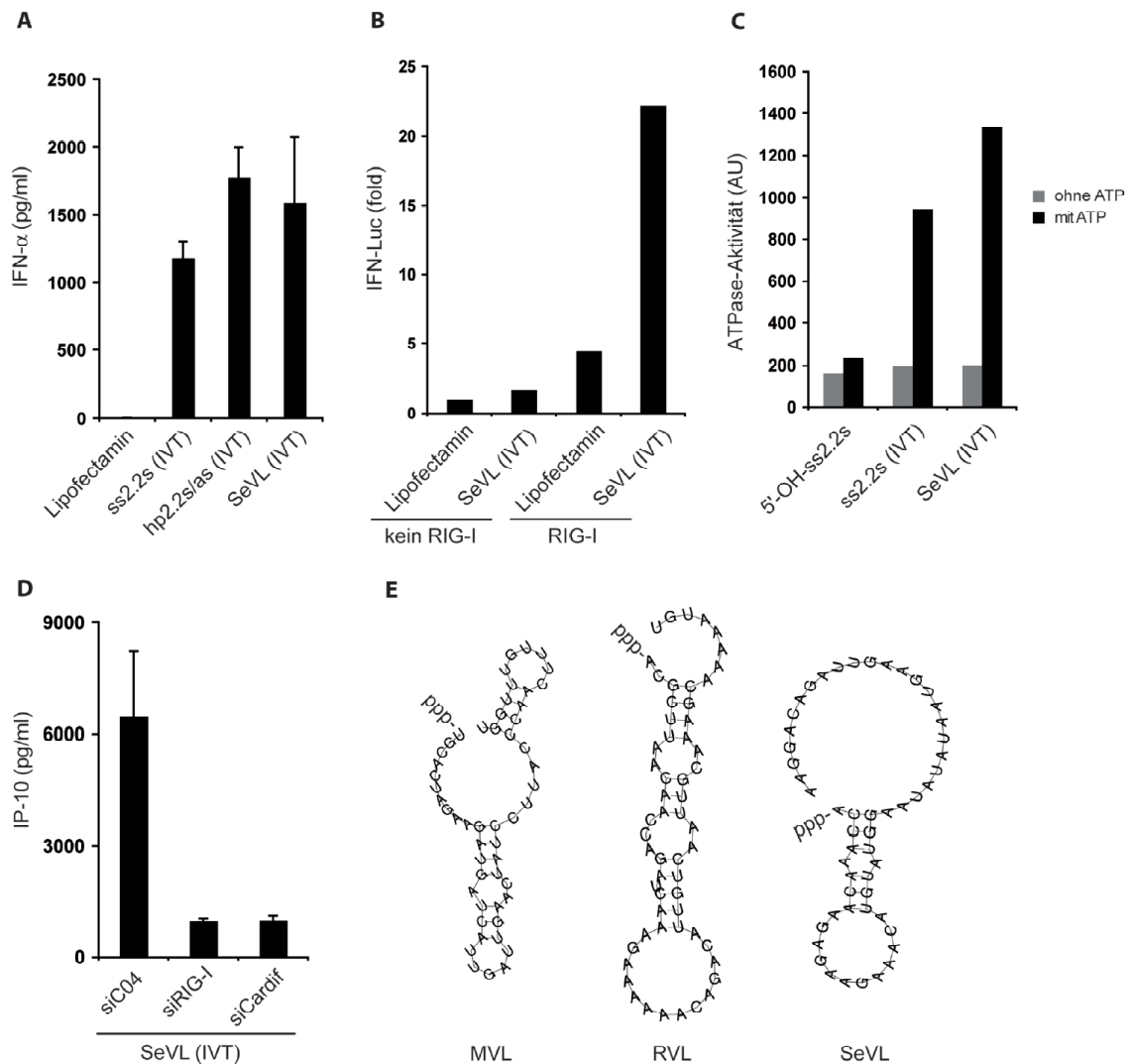
In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob *Leader*-RNAs in der Lage sind, eine RIG-I-vermittelte Immunantwort auszulösen. Dafür wurde die *Leader*-RNA des Sendai Virus durch *in vitro*-Transkription hergestellt und zunächst untersucht, ob diese nach Transfektion in humane Monozyten zu einer Interferonproduktion führt (siehe Abb. 3.17 A). Wie zu erwarten konnte nach 36 Stunden Stimulation eine vergleichbare Menge an Interferon- $\alpha$  im Überstand gemessen werden, wie mit dem IVT-2.2s-Einzelstrang oder der 2.2s/as-Haarnadel-RNA. Um zu zeigen, dass die beobachteten Effekte RIG-I-vermittelt sind, wurde ein IFN- $\beta$ -Reporter-Assay in der embryonalen Nierenzelllinie HEK293 verwendet. Während in nativen Zellen nach Stimulation mit *Leader*-RNA keine Induktion des Interferon- $\beta$ -Reporterkonstrukts beobachtet werden konnte, zeigte sich nach Überexpression von RIG-I und anschließender Stimulation eine deutliche Induktion (siehe Abb. 3.17 B). Weiterhin konnte in der humanen Melanomzelllinie 1205LU durch siRNA-*Knockdown* von RIG-I oder Cardif eine deutliche Abnahme der IP-10 Produktion nach Stimulation mit Sendai-Virus-*Leader*-RNA im Vergleich mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA beobachtet werden (siehe Abb. 3.17 D).

### **3.7.2 Sendai-Virus-*Leader*-RNA aktiviert die ATPase-Aktivität von RIG-I**

Um zu zeigen, dass Sendai-Virus-*Leader*-RNA ebenfalls in der Lage ist, die ATPase-Aktivität von RIG-I zu induzieren, wurde diese ebenfalls in dem bereits beschriebenen



*in vitro* ADP-Assay analysiert (siehe Abb. 3.17 C). Wie erwartet, konnte ein deutlicher ATP-Umsatz durch die *in vitro* transkribierte *Leader*-RNA gemessen werden.



**Abb. 3.17 Virale *Leader*-RNAs verfügen über beide molekulare Erkennungsmuster, die für eine RIG-I-vermittelte Immunantwort erforderlich sind.**

A: Humane Monozyten wurden mit 1  $\mu$ g/ml *in vitro* transkribierter (5'-ppp) RNA der Sequenz der Sendaivirus-*Leader*-RNA stimuliert. 36 Stunden später wurde die im Überstand befindliche Interferon- $\alpha$ -Menge mittels ELISA quantifiziert. Zum Vergleich wurde mit den RNAs ss2.2s (IVT) und hp2.2s/as (IVT) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten nur mit Transfektionsreagenz (Lipofectamin) stimulierte Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung um den Mittelwert eines biologischen Triplikats eines Blutspenders an.

B: Interferon- $\beta$ -Luciferasereporter wurde für 24 Stunden in HEK293-Zellen überexprimiert und zusätzlich die Hälfte der Bedingungen mit 10 ng eines RIG-I-kodierenden Plasmids kotransfiziert. Danach wurden die Zellen für 12 Stunden mit *in vitro* transkribierter Sendaivirus-*Leader*-RNA stimuliert und anschließend die Aktivität des Luciferasereporters ermittelt.

C: Die oben beschriebene Sendaivirus-*Leader*-RNA wurde für zwei Stunden mit rekombinantem RIG-I-Protein inkubiert und anschließend der ATP-Umsatz bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Bedingungen ohne ATP-Zugabe. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten (arbitrary units = AU) angegeben.

D: Humane Melanomzellen der Linie 1205LU wurden mit siRNAs gegen RIG-I und Cardif transfiziert und 48 Stunden später mit 1 µg/ml Sendaivirus-*Leader*-RNA stimuliert. 12 Stunden später wurde die IP10-Menge im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (siC04). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung um den Mittelwert eines biologischen Triplikats an.

E: Die vorhergesagten Sekundärstrukturen der Sequenzen von Sendai-, Masern- und Rabiesvirus-*Leader*-RNA wurden mit RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) ermittelt und sind schematisch dargestellt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Übersicht über die experimentellen Ergebnisse

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente definieren die molekularen und strukturellen Eigenschaften von RNAs, die zu einer Immunantwort durch die zytosolische Helikase RIG-I führen. Durch die Verwendung von *in vitro* transkribierten sowie chemisch synthetisierten RNAs konnte gezeigt werden, dass das PAMP von RIG-I aus einem doppelsträngigen RNA-Abschnitt in relativer Nähe zu dessen 5'-Triphosphat-Modifikation besteht. Durch Bindungsstudien wurden die Rollen der unterschiedlichen RIG-I-Domänen in der Erkennung des zweiteiligen PAMPs beleuchtet.

Zunächst wurden einige in bereits publizierten Studien beschriebene Ergebnisse nochmals überprüft: Kurze, *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNA war in der Lage, nach Transfektion in humane Monozyten, eine Interferonantwort auszulösen. Durch siRNA-Versuche mit der Melanomzelllinie 1205LU konnte gezeigt werden, dass diese Immunantwort durch die zytosolische Helikase RIG-I vermittelt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neben den immunstimulatorischen RNAs, chemisch synthetisierte RNAs ohne 5'-Triphosphat-Modifikation in der Lage waren, die ATPase-Aktivität von RIG-I zu induzieren, wenn diese als Doppelstrang vorlagen.

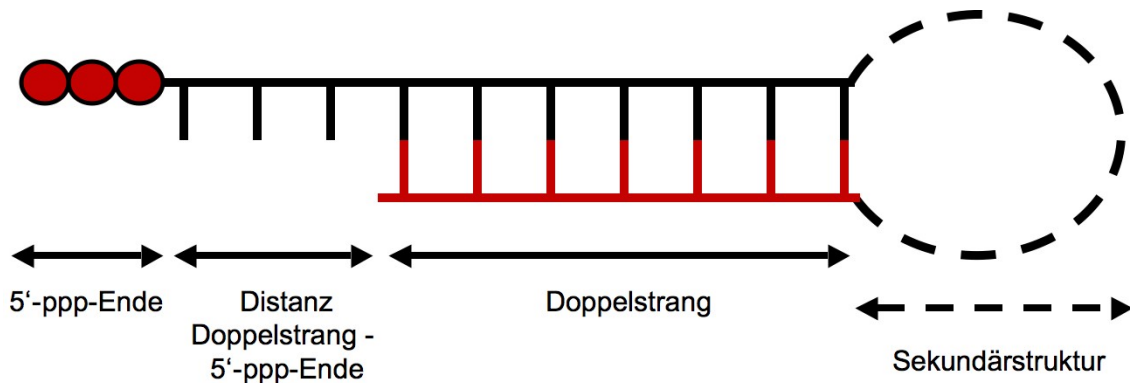
Nach Abspaltung der 5'-Triphosphat-Gruppe von IVT-Einzelstrang-RNA konnte, wie zu erwarten, eine deutliche Reduktion der immunstimulatorischen Potenz beobachtet werden. Erstaunlicherweise war diese dephosphorylierte RNA jedoch weiterhin in der Lage, die ATPase-Aktivität von RIG-I zu induzieren, obwohl ein identisches Verhalten, wie mit einem chemisch synthetisierten 5'-OH-Einzelstrang zu erwarten wäre, welcher keinen ATP-Umsatz induziert.

Dieses überraschende Ergebnis war Anlass für eine genaue Analyse der *in vitro* transkribierten RNAs. Mittels denaturierender Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese konnte gezeigt werden, dass die IVT-RNAs neben dem erwarteten Produkt weitere, deutlich längere Nebenprodukte enthielten. Weitere Experimente zeigten, dass lediglich die längeren, unerwarteten IVT-Produkte immunstimulatorische Eigenschaften besaßen. Auch die ATPase-Aktivität von RIG-I konnte nur durch die unerwarteten Produkte induziert werden.

In bereits veröffentlichten Studien wurde beschrieben, dass ein so genannter *Copy-back*-Mechanismus der viralen T7-Polymerase, welche häufig – wie auch in unserem Falle - für die enzymatische Herstellung von RNA verwendet wird, zur Verlängerung in Form von selbst-komplementären, durch das *Template* nicht vorgegebenen Basen am 3'-Ende der RNA führt (Behrens et al., 1996; Cazenave and Uhlenbeck, 1994; Nacheva and Berzal-Herranz, 2003). Um diese Erklärung zu untermauern, wurden Re-Isolate der unterschiedlichen IVT-Produkte sequenziert. Es zeigte sich, dass die RNAs der erwarteten Länge tatsächlich den vom *Template* kodierten Sequenzen entsprachen. Die unerwarteten IVT-Produkte wiesen jedoch Verlängerungen ihres 3'-Endes auf, welche zur *Template*-kodierten Sequenz komplementär waren und somit haarnadelartige Sekundärstrukturen ausbilden konnten.

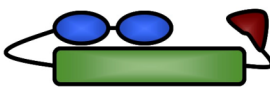


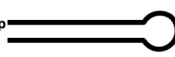
Nach enzymatischer Herstellung dieser Haarnadel-RNAs konnte durch erneute Analyse der IVT-Produkte gezeigt werden, dass diese keine längeren Nebenprodukte enthielten und zudem in der Lage waren, sowohl eine RIG-I-vermittelte Immunantwort auszulösen, als auch die ATPase-Aktivität von RIG-I zu induzieren. Um die strukturellen Eigenschaften von RNA, die für eine RIG-I-Aktivierung notwendig sind, genauer zu analysieren, wurde auf chemisch synthetisierte 5'-Triphosphat-RNA zurückgegriffen, welche bis zum damaligen Zeitpunkt in Studien noch keine Verwendung fand.

Es konnte gezeigt werden, dass ein chemisch synthetisierter 5'-Triphosphat-RNA-Einzelstrang weder in der Lage war, eine Interferonantwort in humanen Monozyten, noch einen RIG-I-vermittelten ATP-Umsatz auszulösen. Erst in doppelsträngiger Form konnte sowohl die ATPase-Aktivität, als auch eine Interferonantwort induziert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass nicht nur eine Mindestanzahl an gepaarten Basen zusätzlich zur 5'-Triphosphatmodifikation vorliegen muss, sondern dass ebenfalls die Entfernung zu dieser eine entscheidende Rolle spielt. Nicht ausschlaggebend für die immunstimulatorische Potenz der RNA war jedoch, ob die Doppelsträngigkeit durch intermolekulare Basenpaarung mit einem komplementären Gegenstrang, oder aber durch intramolekulare Basenpaarung durch das Ausbilden eines Haarnadelstrangs zustande kam. In Abbildung 4.1 sind schematisch die Eigenschaften des PAMPs von RIG-I zusammengefasst.



**Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Eigenschaften des PAMP von RIG-I**

In Bindungsstudien mit unterschiedlichen RIG-I-Konstrukten konnte die Rolle der einzelnen Proteindomänen in der Bindung des zweiteiligen PAMPs spezifiziert werden. Es zeigte sich, dass die C-terminale regulatorische Domäne vorwiegend mit der 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA interagiert, während die Helikasedomäne eine starke Bindung zum doppelsträngigen RNA-Abschnitt eingeht. Die Doppelstrangaffinität der Regulatorischen Domäne war ausschließlich bei gleichzeitigem Vorhandensein der Triphosphat-Modifikation relevant. In Abbildung 4.2 ist eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Bindungsstudien dargestellt.

RNA-Liganden		RIG-I wt 	RIG-I CARD-less 	RIG-I RD 
Synthetische RNA	5'-OH ———	-	-	-
	5'-OH ═════ 5'-OH	+	++	-
	5'-ppp ———	+	+	+
	5'-ppp ═════ 5'-OH	+++	+++	+++
IVT RNA	5'-ppp ——— 	+++	+++	+++

**Abb. 4.2 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Bindungsstudien mit den unterschiedlichen RIG-I-Konstrukten**

Zeichenerklärung: - : keine Bindung; + : schwache Bindung; ++ : mittelstarke Bindung; +++ : starke Bindung

Abschließend wurde die Rolle viraler *Leader*-RNA als potenziell physiologischem RIG-I-Ligand untersucht. Eine Strukturprädiktion ergab, dass die *Leader*-RNA des Sendai Virus die zwei notwendigen Merkmale aufweist, die als PAMP von RIG-I dienen. *In vitro*

transkribierte *Leader*-RNA war in der Lage, eine RIG-I-vermittelte Immunantwort auszulösen sowie dessen ATPase-Aktivität zu induzieren.

Parallel zu den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten wurden in unserer Arbeitsgruppe thematisch verwandte Versuche von Herrn Tobias Schwerd durchgeführt. Die Daten wurden in einer gemeinsamen Arbeit veröffentlicht (*5'-Triphosphate RNA requires base-paired structures to activate signaling via RIG-I*, Schmidt et al., 2009).

## 4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

Die Infektion mit Viren führt beim Menschen zu einer frühen Aktivierung des angeborenen Immunsystems gefolgt von einer Antwort des erworbenen Immunsystems. Das Repertoire der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ist in der Lage, eine Vielzahl an unterschiedlichen Viren zu erkennen und führt schließlich zur vermehrten Transkription von Genen, welche für Typ I Interferone sowie andere Zyto- und Chemokine kodieren (Samuel, 2001).

Neben Rezeptoren, die Kapsid-Bestandteile von Viren oder deren Nukleoproteine erkennen (Bieniasz, 2004; Haller and Weber, 2007), spielt die Detektion fremder Nukleinsäuren bei der antiviralen Abwehr eine entscheidende Rolle. Während die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR3, TLR7, TLR8) virale RNA an der Zelloberfläche und in Endosomen erkennen, also an Orten, an welchen unter normalen Bedingungen wirtseigene RNA nicht zu finden ist, stellt die Überwachung des Zytoplasmas eine besondere Herausforderung dar. Dabei sind die Rezeptoren der kürzlich entdeckten Familie der RIG-I-ähnlichen Helikasen von entscheidender Bedeutung (Yoneyama et al., 2004).

### 4.2.1 Die Eigenschaften des RIG-I-Liganden

Nachdem zunächst lange Doppelstrang-RNA als Ligand für RIG-I vermutet wurde, konnten mehrere Studien die Bedeutung der 5'-Triphosphat-Modifikation in der Differenzierung zwischen wirtseigener und viraler RNA zeigen (Hornung et al., 2006; Kato et al., 2006; Pichlmair et al., 2006; Plumet et al., 2007). Das von Hornung et al. und Pichlmair et al. beschriebene freie 5'-Triphosphat-Ende als Erkennungsmotiv für eine RIG-I-vermittelte Immunantwort war vor dem Hintergrund, dass diese RNA-Struktur physiologischerweise nicht im Zytoplasma zu finden ist, besonders überzeugend. Während initial sowohl virale, als auch wirtseigene RNAs eine Triphosphat-Modifikation

besitzen, wird die im Zellkern erzeugte wirtseigene RNA vor der Freisetzung ins Zytoplasma durch *Caping*, Spaltung oder Basenmodifikation derart verändert, dass das 5'-Triphosphat-Ende für die Detektion durch RIG-I nicht mehr zugänglich oder vorhanden ist (Hornung et al., 2006). Passend dazu war die Beobachtung durch Habian et al., dass manche Viren die Auslösung einer Immunantwort durch Prozessierung des 5'-Endes ihres Genoms umgehen können (Habjan et al., 2008).

In den Arbeiten von Hornung et al. sowie Pichlmair et al. wurden jedoch *in vitro* transkribierte RNAs verwendet, die keiner detaillierten Analyse unterzogen wurden. Die hier vorliegenden Ergebnisse, welche 2009 in der Arbeit Schmidt et al. (Schmidt et al., 2009) publiziert wurden, zeigen jedoch, dass die 5'-Triphosphat-Modifikation von RNAs als alleiniges PAMP für RIG-I nicht ausreichend ist. Erst durch die Kombination mit einem doppelsträngigen Abschnitt von ca. 10 Nukleotiden Länge in relativer Nähe zur 5'-Triphosphat-Modifikation sind die Kriterien des PAMPs für RIG-I erfüllt.

Die in dieser Arbeit beschriebene Analyse der IVT-Produkte belegt, dass Rückschlüsse über strukturelle Ligandeneigenschaften von *in vitro* transkribierten RNAs kritisch hinterfragt werden müssen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht-*Template*-kodierte Nebenprodukte, die vermutlich durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität der T7-Polymerase entstehen, für die RIG-I-vermittelten immunstimulatorischen Effekte verantwortlich sind. Dieser als *Copy-back* bezeichnete Mechanismus wurde auch für die viralen RNA-Polymerasen des Hepatitis C Virus und Sendai Virus beschrieben, welche RIG-I-abhängig erkannt werden (Behrens et al., 1996; Leppert et al., 1977; Zhong et al., 1999). Mit Hilfe einer synthetisch hergestellten Triphosphat-RNA, welche in bis zum damaligen Zeitpunkt publizierten Studien noch keine Verwendung fand, konnte hingegen eindeutig gezeigt werden, dass diese als Einzelstrang keine immunstimulatorischen Eigenschaften besitzt. Erst nach Hybridisierung eines komplementären Gegenstranges konnte eine RIG-I-abhängige Immunantwort beobachtet werden.

Die Kernaussagen der hier vorliegenden Arbeit konnten durch eine unabhängige Studie von Schlee et al. bestätigt werden (Schlee et al., 2009), welche ebenfalls auf synthetisch hergestellte Triphosphat-RNA zurückgriff. Auch sie konnten beobachten, dass erst nach Hybridisierung eines komplementären Gegenstranges die synthetische Triphosphat-RNA in der Lage war, eine RIG-I-vermittelte Immunantwort auszulösen.

Bezüglich der minimalen Doppelsträngigkeit, die für eine Aktivierung von RIG-I notwendig ist, kamen Schlee et al. jedoch auf unterschiedliche Ergebnisse: Der 24 Nukleotide lange 5'-Triphosphat-RNA-Einzelstrang in ihren Experimenten benötigte

einen mindestens 21 Nukleotide langen Gegenstrang, um eine Immunantwort auszulösen, wohingegen in der hier vorliegenden Arbeit ein Doppelstrang von nur 10 Nukleotiden ausreichend war (Schlee et al., 2009; Schmidt et al., 2009). Berücksichtigt man zusätzlich die Haarnadel-RNAs, reichten sogar 7 gepaarte Nukleotide (Klon 1) aus, um RIG-I zu aktivieren. Obwohl hier gezeigt werden konnte, dass für die RIG-I-Aktivierung nicht ausschlaggebend ist, ob der doppelsträngige Abschnitt der RNA durch Paarung zweier komplementärer Stränge oder durch intramolekulare Paarung selbstkomplementärer Abschnitte zustande kommt, ist dennoch vorstellbar, dass die Schleife einer Haarnadel-RNA einen stabilisierenden Einfluss auf die Stammstruktur hat und somit eine geringere Anzahl gepaarter Basen ausreichend sind (Uhlenbeck et al., 1973).

Ein weiterer Unterschied liegt in dem Einfluss von überhängenden Nukleotiden im Bereich der 5'-Triphosphat-Region. Sowohl Schlee et al. als auch Schmidt et al. zeigen, dass eine Verlängerung des Gegenstrangs über das 5'-Triphosphat-Ende hinaus zu einer deutlichen Reduktion der Interferonantwort führt (Schlee et al., 2009; Schmidt et al., 2009). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die überschüssigen Basen das Triphosphat-Ende verdecken und somit die Erkennung durch RIG-I einschränken. Wird jedoch der Gegenstrang von seinem 3'-Ende her verkürzt, so dass das Triphosphat-Ende ungepaart vorliegt, beobachten Schlee et al. einen vollständigen Verlust der RIG-I-Aktivierung, während in unseren Versuchen im Fall von synthetischen Liganden mindestens eine Base, im Fall der IVT-Haarnadel-RNAs sogar mehrere Basen Abstand des doppelsträngigen Abschnitts zum Triphosphat-Ende toleriert werden.

Schlee et al. betonen die Wichtigkeit der Paarung der Triphosphat-tragenden Base am 5'-Ende, indem sie *in vitro* transkribierte „Pfannenstiel-RNA“ der Sequenz des Rabies Virus Genoms untersuchen und somit dessen physiologische Relevanz hervorheben. Als Kontrolle verwenden sie eine *mismatch*-Pfannenstiel-RNA, die am 5'-Ende neben zwei ungepaarten Basen einen Poly-A-Schwanz enthält, der das 5'-Triphosphat-Ende überragt. Ob die deutlich schlechtere Immunstimulation der *mismatch*-RNA aus den ungepaarten Basen am 5'-Ende oder dem Einfluss des Poly-A-Schwanzes resultiert, geht aus den Versuchen jedoch nicht hervor.

Auch der im letzten Teil dieser Arbeit durch die Versuche mit *Leader*-RNA hergestellte Bezug zu potentiell physiologisch relevanten RIG-I-Liganden muss vorsichtig betrachtet werden: Zwar beschrieben Plumet et al., dass virale *Leader*-RNA als möglicher Ligand von RIG-I eine Interferonantwort auslösen kann (Plumet et al., 2007). Auch die Strukturprädiktion viraler *Leader*-RNAs weist das für RIG-I als notwendig beschriebene



PAMP auf. Dennoch wäre eine Analyse mit synthetisch hergestellten Liganden den Versuchen mit *in vitro* transkribierter RNA überlegen. Zudem konnten in 2010 erschienenen Studien gezeigt werden, dass im Falle einer Infektion mit Sendai Virus am ehesten genomische RNA-Fragmente beziehungsweise sogenannte DI (*defective interfering*)-Genome für die RIG-I-vermittelte Immunantwort verantwortlich sind (Rehwinkel et al., 2010).

Neben der 5'-Triphosphat-Modifikation wurden auch andere RNA-Modifikationen als PAMP von RIG-I beschrieben. Marques et al. postulierten, dass synthetische Doppelstrang-RNAs mit glatten 5'- und 3'-OH-Enden durch RIG-I erkannt werden, während RNAs mit 3'-Überhängen zu keiner Interferonantwort führen (Marques et al., 2006). Als Indikator für die Induktion einer Immunantwort wurde dabei in der Glioblastomzelllinie T98G p56 als Typ-I-Interferon-induziertes Protein verwendet. Überraschenderweise konnte in HeLa- und HT1080-Zellen, welche nach Transfektion mit *in vitro* transkribierter RNA eine deutliche p56-Induktion zeigen, ein entsprechendes Ergebnis mit synthetischer Doppelstrang-RNA nicht beobachtet werden. Takahasi et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Bindung von RNA an RIG-I ausschließlich von ihrer Doppelsträngigkeit, nicht jedoch der Beschaffenheit des 5'- oder 3'-Endes abhängt. Für eine Signaltransduktion via RIG-I postulierten sie jedoch die Notwendigkeit von 5'- oder 3'-Monophosphaten (Takahasi et al., 2008). In unseren eigenen sowie Versuchen anderer Labors konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden (Schlee et al., 2009; Schmidt et al., 2009).

Malathi et al. hingegen beschrieben, dass Spaltprodukte der antiviralen Endoribonuklease RNase L bei der Induktion einer Typ-I-Interferonantwort via RIG-I ausschlaggebend seien (Malathi et al., 2007). Dabei entstehen aus einzelsträngiger wirtseigener RNA kurze (< 200 Nukleotide) Spaltprodukte, welche eine 5'-OH- und 3'-Monophosphat-Modifikation aufweisen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sowohl RIG-I, als auch MDA-5 in der Erkennung dieser Spaltprodukte involviert sind. Ein strukturelles Motiv, welches eine Erkennung durch RNA-Helikasen erklären würde, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht beschrieben.

Andere Autoren wiederum betonten die Wichtigkeit der Länge der RNA als ausschlaggebendes Kriterium für eine Erkennung durch RIG-I. Kato et al. verwendeten das kommerziell erhältliche Strukturanalog doppelsträngiger RNA, Poly(I:C), und verdauten es mit RNase III (Kato et al., 2008). Sie beobachteten, dass langes Poly(I:C) im Bereich von 7 Kilobasen überwiegend durch MDA-5 detektiert wird, während kürzere Spaltprodukte von Poly(I:C) im Bereich von 300 Basenpaaren ausschließlich

durch RIG-I erkannt werden. Der Erkennungsbereich von RNAs durch Helikasen der SF2-Familie liegt jedoch bei ca. 6-7 Basenpaaren (Durr et al., 2006). Wie strukturell ähnliche Helikasen RNAs unterscheiden, deren Länge den Erkennungsbereich dieser Helikasen um mehr als das 100-fache übersteigt, ist schwer vorstellbar. Bei der Verwendung von chemisch synthetisierter Doppelstrang-RNA von 70 Nukleotiden Länge, konnten zudem nur minimale Interferonmengen gemessen werden (Kato et al., 2008) und deren immunstimulatorische Eigenschaft in eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Des Weiteren wurde in einer Studie von Ranjith-Kumar et al. eine differentielle RNA-Erkennung von RIG-I und MDA-5 in wesentlich kleineren Längenbereichen beschrieben (Ranjith-Kumar et al., 2009).

Wie prinzipiell eine Längendifferenzierung von Liganden durch RIG-I funktionieren könnte, wurde von einer Forschergruppe um Myong beschrieben (Myong et al., 2009). Mit Hilfe einer auf Fluoreszenz basierenden Methode konnten sie zeigen, dass rekombinantes RIG-I-Protein in der Lage ist, sich unter ATP-Verbrauch auf einer fixierten 25 Nukleotide langen Doppelstrang-RNA entlang zu bewegen. Interessanterweise war dabei die Translokationsgeschwindigkeit deutlich höher, wenn die RNA eine 5'-Triphosphat-Modifikation enthielt. Im Gegensatz zur ATP-Hydrolyse ist jedoch bislang nicht geklärt, ob die Translokation entlang der RNA für die Signaltransduktion zwingend notwendig ist.

Auch der Einfluss der Sequenz von RNA wurde von manchen Autoren betont. Saito et al. stellten kleine Abschnitte genomischer RNA des Hepatitis C Virus (HCV) mittels *in vitro* Transkription her und untersuchten deren immunstimulatorische Potenz via RIG-I (Saito et al., 2008). Aus ihren Ergebnissen schlossen sie, dass ein 100 Nukleotide langer U- oder A-reicher Bereich 8000 Nukleotide entfernt vom 5'-Triphosphat-Ende für die RIG-I-Aktivierung ausschlaggebend sei. Um die *in vivo*-Relevanz ihrer Beobachtung zu untermauern, verglichen sie die Interferonantwort eines Volllängentranskripts genomischer HCV-RNA mit einem Transkript, deren nichttranslatiertes 3'-Ende um 230 Nukleotide gekürzt war und somit auch nicht die vermeintlich immunstimulatorische Sequenz enthielt. Obwohl das gekürzte Transkript nicht immunstimulatorisch war, wurde jedoch der Einfluss dieser Genommodifikation auf Translation und Replikation des Virus nicht untersucht. In der hier vorliegenden Arbeit wurde zwar der Einfluss der Sequenz der RNA nicht systematisch untersucht. Die verwendeten Modellliganden waren jedoch weder A- noch U-reich (< 50% A+U).

In der Arbeit von Schlee et al. konnte ebenfalls ein gewisser Einfluss der RNA-Sequenz auf die immunstimulatorische Potenz von RIG-I-Liganden beobachtet werden. Sie

zeigten, dass die erste, das Triphosphat tragende Base im Falle von A, G oder U dem Liganden eine höhere Potenz verleiht als im Falle von C (Schlee et al., 2009). Um die RNA-Sequenz als allgemein gültiges PAMP-Kriterium einzustufen, ist die Datenlage jedoch sicherlich nicht ausreichend.

Eine völlig neue Perspektive auf potentielle RIG-I-Liganden entstand durch zwei Studien, die zeigten, dass RIG-I in der TLR-9-unabhängigen Erkennung von DNA involviert ist (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2009). Es ist zwar bekannt, dass DNA als PAMP TLR-unabhängige Immunantworten in Zellen auslösen kann (Cheng et al., 2007; Ishii et al., 2006; Stetson and Medzhitov, 2006). Ablasser et al. und Chiu et al. zeigen jedoch, dass eine Aktivierung von RIG-I indirekt erfolgt: Dabei wird mittels DNA, die während der Infektion mit einem Virus in Zellen eindringt, durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase III 5'-Triphosphat-RNA generiert, welche als RIG-I-Ligand fungiert. Interessanterweise betonen beide Studien, dass für die Aktivierung von RIG-I neben der 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA zusätzlich doppelsträngige RNA-Abschnitte vorliegen müssen (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2009). Dieses Ergebnis lässt sich ideal mit dem in dieser Arbeit beschriebenen PAMP, das durch RIG-I erkannt wird vereinbaren.

#### **4.2.2 Von Liganden-Bindung zur Signaltransduktion – Einfluss der verschiedenen Proteindomänen auf die RIG-I-Aktivierung**

RIG-I gehört, ebenso wie MDA5 und LGP2, zu den *superfamily-2*-Helikasen. Diese enthalten jeweils sieben konservierte Sequenzmotive, welche die ATP- und Nukleinsäurebindung vermitteln (Gorbalenya et al., 1988; Hopfner and Michaelis, 2007). Die ATP-Hydrolyse wird in der Regel durch Bindung von Nukleinsäuren induziert und resultiert in einer Konformationsänderung unterschiedlicher Proteindomänen zueinander. Dabei können SF-2-Helikasen vielfältige Funktionen ausüben, die von der Entwindung von Nukleinsäuren, gerichtetem Transport bis hin zur Modifikation von Protein-Nukleinsäure-Komplexen reichen.

RIG-I verfügt über zwei N-terminale CARD-Domänen, eine zentrale SF-2 DECH box-ATPase-Domäne sowie eine C-terminale Domäne. Durch Mutationen in der ATP-Bindestelle der DECH box-Domäne konnte gezeigt werden, dass die ATP- und Nukleinsäure-abhängigen Konformationsänderungen essentiell für die antivirale Signaltransduktion sind (Hornung et al., 2006; Yoneyama et al., 2004).

Während die N-terminalen CARD-Domänen überwiegend die Signalweiterleitung über das mitochondrial lokalisierte Protein Cardif vermitteln, konnten Cui et al. zeigen, dass die C-terminale Regulatorische Domäne (RD) von RIG-I als Sensor der 5'-Triphosphatgruppe von RNA fungiert (Cui et al., 2008). Mit Hilfe der Kristallstruktur der RD konnte eine Zink-Bindedomäne gefunden werden, die mit GDP/GTP-Austauschproteinen der *Rab-like* GTPasen strukturverwandt ist und sich als entscheidend für die Signaltransduktion erwies (Cui et al., 2008). Die RD von RIG-I enthält zudem eine spezifische Schleife mit mehreren positiv geladenen Seitenketten, die die Erkennung der negativ geladenen 5'-Triphosphatgruppe der RNA ermöglichen (Li et al., 2009; Lu et al., 2010a; Lu et al., 2010b; Wang et al., 2010). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die CARD-Domänen Einfluss auf die Ligandenbindung haben. Myong et al. stellten fest, dass sich ein RIG-I-Proteinkonstrukt ohne CARD-Domänen schneller auf Doppelstrang-RNA bewegt als Vollängen-RIG-I (Myong et al., 2009). Dies weist auf die inhibierende Wirkung der CARD-Domänen hin.

Betrachtet man nun die in dieser Arbeit gezeigten Bindungsstudien der synthetischen Modellliganden mit den unterschiedlichen Proteinkonstrukten von RIG-I, lassen sich die Ergebnisse sehr gut mit den oben beschriebenen Beobachtungen anderer Studien vereinbaren. Es konnte gezeigt werden, dass die 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA vornehmlich mit der Regulatorischen Domäne interagiert, während die Bindung des Doppelstrangs überwiegend durch die Helikasedomäne erfolgt. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass ein Doppelstrang ohne Triphosphat-Modifikation besser an RIG-I bindet, wenn die CARD-Domänen nicht vorhanden sind. Dieses Ergebnis lässt sich durch die inhibierende Wirkung der CARD-Domänen bei Vollängen-RIG-I erklären.

Basierend auf den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen sowie den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, kann aktuell von folgendem Modell der RIG-I-Aktivierung ausgegangen werden:

- i) RIG-I bindet bevorzugt Doppelstrang-RNA, die eine 5'-Triphosphat-Modifikation enthält.
- ii) Die initiale Erkennung erfolgt an der RD durch die 5'-Triphosphatgruppe.
- iii) RIG-I bildet Homodimere aus und es erfolgt eine Translokation am nahe gelegenen doppelsträngigen RNA-Abschnitt.
- iv) Die Translokation führt zu einer Exposition der CARD-Domänen, was die Signaltransduktion über das mitochondrial lokalisierte Protein IPS-1 ermöglicht.

Dieses Modell wird in weiten Teilen ebenfalls durch die jüngsten strukturellen Studien zur RIG-I-Aktivierung gestützt (Kowalinski et al., 2011; Luo et al., 2011).

#### 4.2.3 Physiologische RIG-I-Liganden

Es ist bekannt, dass nicht nur Doppelstrang-RNA-Viren, sondern auch Einzelstrang-(+)-RNA-Viren größere Mengen zytosolischer Doppelstrang-RNA während ihres Replikationszyklus erzeugen, was eine Erkennung durch RIG-I ermöglicht (Habjan et al., 2008; Hornung et al., 2006; Kato et al., 2005; Loo et al., 2008; Weber et al., 2006). Dagegen wurde für Einzelstrang-(-)-RNA-Viren beschrieben, dass diese im Laufe der Infektion keine Doppelstrang-RNA ausbilden (Pichlmair et al., 2006; Weber et al., 2006). Dennoch können sie RIG-I aktivieren. Zu beachten ist dabei jedoch, dass der Antikörper, der die Abwesenheit von Doppelstrang-RNA belegen sollte, diese erst ab einer Länge von 40 Basenpaaren erkennt (Bonin et al., 2000).

Ähnlich wie andere Einzelstrang-(-)-RNA-Viren enthalten Influenza-Viren komplementäre 5'- und 3'-Sequenzen, die in der Lage sind, kurze doppelsträngige Abschnitte im Sinne eines Pfannenstils auszubilden (Hsu et al., 1987). Somit verfügen sie über das in dieser Arbeit beschriebene PAMP von RIG-I, einer 5'-Triphosphat-Modifikation in der Nähe eines Doppelstrangs. Entsprechend konnten Rehwinkel et al. durch *Pull-down*- und Längenfragmentanalyse-Versuche zeigen, dass an RIG-I gebundene immunstimulatorische RNAs genomischen Segmenten von Influenzaviren entsprechen (Rehwinkel et al., 2010).

Andere Studien konnten zeigen, dass Sendai- und VSV-Viren so genannte *defective interfering* (DI) Genome während ihres Replikationszyklus produzieren, welche fehlerhaften Nebenprodukten der Replikation entsprechen (Kolakofsky, 1979; Lazzarini et al., 1981; Perrault and Leavitt, 1978). Von den drei unterschiedlichen DI-Typen (Lazzarini et al., 1981) (*Deletion*, *Panhandle* und *Snap back*) erfüllen zwei (*Panhandle* und *Snap back*) die in dieser Arbeit beschriebenen Voraussetzungen des PAMPs von RIG-I. In Einklang mit diesen Ergebnissen konnten Strähle et al. zeigen, dass das Ausmaß der RIG-I-vermittelten Immunantwort mit dem Vorhandensein von *Snap back* DI-Partikeln in den verwendeten Sendaivirus-Präparationen korreliert (Baum et al., 2010; Strähle et al., 2007).

Inwiefern sich diese Ergebnisse auch auf andere Viren übertragen lassen, werden systematische Studien mit Hilfe von chemisch synthetisierten 5'-Triphosphat-RNAs in Zukunft zeigen müssen. Zu berücksichtigen ist dabei jedoch auch, dass das alleinige

Vorhandensein eines RIG-I-Liganden nicht zwingend dessen Aktivierung bedeutet. Manche Viren haben Strategien entwickelt, einer Erkennung durch RIG-I auszuweichen. Beispiele dafür sind die NS3/4-Protease von Hepatitis C-Viren, welche das Adapterprotein IPS-1 spaltet (Baril et al., 2009), das RSV-Protein NS2, das mit RIG-I interagiert (Ling et al., 2009) sowie das NS1-Protein der Influenza A-Viren, das einen Komplex mit RIG-I und IPS-1 bildet (Pichlmair et al., 2006).

### 4.3 Klinischer Einsatz von RIG-I-Liganden

Eine wesentliche Frage besteht darin, wie die in dieser und anderen Arbeiten gewonnenen Erkenntnisse über die Aktivierung von RIG-I in der Therapie von Erkrankungen eingesetzt werden können. Dass definierte RIG-I-Liganden bei der Bekämpfung von Infektionen mit Viren eingesetzt werden könnten, um eine gezielte Immunantwort auszulösen, ist naheliegend. Aber auch der Einsatz bei neoplastischen Erkrankungen ist möglich. „Suggeriert“ man einer Tumorzelle durch Applikation von RIG-I-Liganden, sie sei von einem Virus befallen, kann eine gezielte Induktion des körpereigenen Immunsystems die Bekämpfung dieser entarteten Zellen bewirken.

Die chemische Synthese von Triphosphat-RNA-Liganden hätte dabei nicht nur den Vorteil, dass Gewissheit über die exakte Sequenz und Struktur der RNA vorliegt. Auch die gezielte Modifikation einzelner Basen zur Beeinflussung der pharmakokinetischen und –dynamischen Eigenschaften wäre denkbar.

Ein besonders geschickter therapeutischer Ansatz gelang Pöck et al.: Sie kombinierten die immunstimulatorische Eigenschaft von *in vitro* transkribierter Triphosphat-RNA mit der Fähigkeit, diese als siRNA zu nutzen und setzten diese bi-funktionalen Moleküle als Tumorthherapie ein. Sie konnten zeigen, dass sowohl der *Knock down* des antiapoptotischen Proteins *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), als auch die Aktivierung von RIG-I für den Erfolg ihres Therapieansatzes von Melanomen und Kolonkarzinomen im Mausmodell verantwortlich sind (Poeck et al., 2008). In anderen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivierung von RIG-I die Induktion von Tumorzellapoptose bewirkt und neben dem Typ I-Interferon- ebenfalls der *Inflammasome*-Signalweg aktiviert wird (Besch et al., 2009; Poeck et al., 2010).

Eine gezielte Aktivierung dieser unterschiedlichen Mechanismen durch definierte RIG-I-Liganden könnte somit eine entscheidende Ausweitung der therapeutischen Möglichkeiten im Kampf gegen virale Infektions- und Tumorerkrankungen darstellen.

---

Durch weitere Erkenntnisse in den nächsten Jahren ist jedoch auch eine Anwendung auf anderen Gebieten, wie z.B. der Entwicklung neuer Impfstoffe zu erwarten.

## 5. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, eine schnelle und effektive Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen zu vermitteln. Dabei werden durch spezielle Rezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) konservierte molekulare Strukturen von Pathogenen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkannt, die im Wirtsorganismus nicht vorhanden sind. Dies führt zu einer Reihe von Reaktionen, wie zum Beispiel der Produktion und Ausschüttung von Zytokinen, die eine Bekämpfung der Mikroorganismen bewirken. Im Fall einer Virusinfektion ist die Erkennung durch das angeborene Immunsystem jedoch deutlich schwieriger, da Viren den wirtseigenen Metabolismus und Syntheseapparat nutzen. Hier kommt der Detektion viraler Nukleinsäuren über ihre unphysiologische Lokalisation oder ihre spezielle chemische Modifikation eine besondere Bedeutung zu.

Für die Erkennung viraler RNAs im Zytosol spielen die RIG-I-ähnlichen Helikasen RIG-I, MDA5 und LGP2 eine entscheidende Rolle. In den vergangenen Jahren erschienen zahlreiche, jedoch sehr kontroverse Studien über die strukturellen Voraussetzungen von RNAs, die für eine Aktivierung von RIG-I erforderlich seien. 2006 konnten Hornung et al. und Pichlmair et al. zeigen, dass eine 5'-Triphosphat-Modifikation, wie sie unter anderem von viralen Polymerasen erzeugt wird, als Erkennungsmuster einer RIG-I-getriggerten Immunantwort dient (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Dass eine 5'-Triphosphat-Modifikation das einzige Erkennungsmuster ist, das von RIG-I erkannt wird, wurde jedoch durch eine Reihe von weiteren Studien in Frage gestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das PAMP von RIG-I im Detail untersucht und konnte dadurch neu definiert werden: Es besteht aus zwei Teilen, einer 5'-Triphosphat-Modifikation und einem in relativer Nähe dazu gelegenen, mindestens 7 bis 10 Basen umfassenden, basengepaarten RNA-Abschnitt.

Die vorliegende Arbeit konnte als Hauptgrund für die bisher widersprüchliche Vorstellung über die Natur des RIG-I-Liganden die in vielen Studien unkritisch verwendete Herstellung der als RIG-I-Stimuli eingesetzten RNAs durch *in vitro*-Transkription identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass die T7-Polymerase durch den so genannten *Copy back*-Mechanismus und ihre RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität zusätzlich zu den in der Reaktion erwarteten RNAs Nebenprodukte mit selbstkomplementären Verlängerungen generiert. Gerade diese unerwarteten, selbstkomplementären und damit basengepaarten Nebenprodukte sind



für die RIG-I-Aktivierung verantwortlich. Durch die Verwendung von chemisch synthetisierten Triphosphat-RNAs konnte zudem belegt werden, dass diese in einzelsträngiger Form weder in der Lage sind, eine RIG-I-vermittelte Interferonantwort auszulösen, noch dessen ATPase-Aktivität zu induzieren. Die ATPase-Aktivität von RIG-I lässt sich durch doppelsträngige RNA ab einer Länge von 7 bis 10 Basen unabhängig von der Anwesenheit eines 5'-Triphosphats induzieren. Die ATPase-Aktivität ist zwar eine notwendige, aber noch nicht hinreichende Voraussetzung um RIG-I vollständig zu aktivieren und es bedarf sowohl eines 5'-Triphosphates, als auch des doppelsträngigen Abschnittes, um eine RIG-I abhängige Interferonantwort auszulösen.

In Bindungsstudien mit unterschiedlichen RIG-I-Konstrukten zeigte sich, dass die C-terminale Regulatorische Domäne vorwiegend mit der 5'-Triphosphat-Modifikation der RNA interagiert, während die Helikasedomäne eine starke Bindung zum doppelsträngigen RNA-Abschnitt eingeht.

Die exakte Kenntnis des PAMPs von RIG-I wird es in der Zukunft erlauben, durch gezielte Aktivierung das körpereigene Abwehrsystem bei der Bekämpfung von Infektions- und Tumorerkrankungen zu nützen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K. A., and Hornung, V. (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 10, 1065-1072.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Baltimore, D. (1971). Viral genetic systems. *Trans N Y Acad Sci* 33, 327-332.
- Baril, M., Racine, M. E., Penin, F., and Lamarre, D. (2009). MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Virol* 83, 1299-1311.
- Barral, P. M., Sarkar, D., Su, Z. Z., Barber, G. N., DeSalle, R., Racaniello, V. R., and Fisher, P. B. (2009). Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther* 124, 219-234.
- Baum, A., Sachidanandam, R., and Garcia-Sastre, A. (2010). Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16303-16308.
- Behrens, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *The EMBO Journal* 15, 12-22.
- Besch, R., Poeck, H., Hohenauer, T., Senft, D., Hacker, G., Berking, C., Hornung, V., Endres, S., Ruzicka, T., Rothenfusser, S., and Hartmann, G. (2009). Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* 119, 2399-2411.
- Bieniasz, P. D. (2004). Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 5, 1109-1115.
- Bogdan, C. (2000). The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol* 12, 419-424.
- Bonin, M., Oberstrass, J., Lukacs, N., Ewert, K., Oesterschulze, E., Kassing, R., and Nellen, W. (2000). Determination of preferential binding sites for anti-dsRNA antibodies on double-stranded RNA by scanning force microscopy. *RNA* 6, 563-570.
- Bos, L. (1999). Beijerinck's work on tobacco mosaic virus: historical context and legacy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 675-685.
- Breitbart, M., and Rohwer, F. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* 13, 278-284.
- Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L., and Brussow, H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* 6, 417-424.
- Cazenave, C., and Uhlenbeck, O. C. (1994). RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6972-6976.
- Cheng, G., Zhong, J., Chung, J., and Chisari, F. V. (2007). Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9035-9040.
- Chiu, Y. H., Macmillan, J. B., and Chen, Z. J. (2009). RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576-591.

- Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K. K., Krug, A., and Hopfner, K. P. (2008). The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Molecular cell* 29, 169-179.
- Delves, P. J., and Roitt, I. M. (2000). The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343, 37-49.
- Dixit, E., Boulant, S., Zhang, Y., Lee, A. S., Odendall, C., Shum, B., Hacohen, N., Chen, Z. J., Whelan, S. P., Fransen, M., *et al.* (2010). Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* 141, 668-681.
- Durr, H., Flaus, A., Owen-Hughes, T., and Hopfner, K. P. (2006). Snf2 family ATPases and DExx box helicases: differences and unifying concepts from high-resolution crystal structures. *Nucleic Acids Res* 34, 4160-4167.
- Farrar, M. A., and Schreiber, R. D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11, 571-611.
- Fraser, I. P., Koziel, H., and Ezekowitz, R. A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10, 363-372.
- Gee, P., Chua, P. K., Gevorkyan, J., Klumpp, K., Najera, I., Swinney, D. C., and Deval, J. (2008). Essential role of the N-terminal domain in the regulation of RIG-I ATPase activity. *J Biol Chem* 283, 9488-9496.
- Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S., and Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8459-8464.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., and Blinov, V. M. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett* 235, 16-24.
- Habjan, M., Andersson, I., Klingstrom, J., Schumann, M., Martin, A., Zimmermann, P., Wagner, V., Pichlmair, A., Schneider, U., Muhlberger, E., *et al.* (2008). Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One* 3, e2032.
- Haller, O., and Weber, F. (2007). Pathogenic viruses: smart manipulators of the interferon system. *Curr Top Microbiol Immunol* 316, 315-334.
- Hopfner, K. P., and Michaelis, J. (2007). Mechanisms of nucleic acid translocases: lessons from structural biology and single-molecule biophysics. *Curr Opin Struct Biol* 17, 87-95.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., *et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997.
- Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M., and Palese, P. (1987). Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8140-8144.
- Huang, F., Adelman, J., Jiang, H., Goldstein, N. I., and Fisher, P. B. (1999). Differentiation induction subtraction hybridization (DISH): a strategy for cloning genes displaying differential expression during growth arrest and terminal differentiation. *Gene* 236, 125-131.
- Isaacs, A., Lindenmann, J., and Valentine, R. C. (1957). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 268-273.

- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., *et al.* (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7, 40-48.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-995.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205, 1601-1610.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., *et al.* (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101-105.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6, 981-988.
- Kim, D. H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E., and Rossi, J. J. (2004). Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 22, 321-325.
- Kolakofsky, D. (1979). Studies on the generation and amplification of sendai virus defective-interfering genomes. *Virology* 93, 589-593.
- Koonin, E. V., Senkevich, T. G., and Dolja, V. V. (2006). The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol Direct* 1, 29.
- Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A. A., Loubser, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D., and Cusack, S. (2011). Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* 147, 423-435.
- Lazzarini, R. A., Keene, J. D., and Schubert, M. (1981). The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* 26, 145-154.
- Le Bon, A., and Tough, D. F. (2002). Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 14, 432-436.
- Leppert, M., Kort, L., and Kolakofsky, D. (1977). Further characterization of Sendai virus DI-RNAs: a model for their generation. *Cell* 12, 539-552.
- Li, X., Ranjith-Kumar, C. T., Brooks, M. T., Dharmiah, S., Herr, A. B., Kao, C., and Li, P. (2009). The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA. *J Biol Chem* 284, 13881-13891.
- Ling, Z., Tran, K. C., and Teng, M. N. (2009). Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *J Virol* 83, 3734-3742.
- Loo, Y. M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M. A., Garcia-Sastre, A., Katze, M. G., and Gale, M., Jr. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* 82, 335-345.
- Lu, C., Ranjith-Kumar, C. T., Hao, L., Kao, C. C., and Li, P. (2010a). Crystal structure of RIG-I C-terminal domain bound to blunt-ended double-strand RNA without 5' triphosphate. *Nucleic Acids Res* 39, 1565-1575.
- Lu, C., Xu, H., Ranjith-Kumar, C. T., Brooks, M. T., Hou, T. Y., Hu, F., Herr, A. B., Strong, R. K., Kao, C. C., and Li, P. (2010b). The structural basis of 5' triphosphate

- double-stranded RNA recognition by RIG-I C-terminal domain. *Structure* 18, 1032-1043.
- Luo, D., Ding, S. C., Vela, A., Kohlway, A., Lindenbach, B. D., and Pyle, A. M. (2011). Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell* 147, 409-422.
- Luria, S. E. (1960). Viruses, cancer cells, and the genetic concept of virus infection. *Cancer Res* 20, 677-688.
- Lwoff, A., Horne, R. W., and Tournier, P. (1962). [A virus system]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 254, 4225-4227.
- Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr., and Silverman, R. H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 448, 816-819.
- Marques, J. T., Devosse, T., Wang, D., Zamanian-Daryoush, M., Serbinowski, P., Hartmann, R., Fujita, T., Behlke, M. A., and Williams, B. R. (2006). A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 24, 559-565.
- Marrack, P., Kappler, J., and Mitchell, T. (1999). Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 189, 521-530.
- Melchjorsen, J., Jensen, S. B., Malmgaard, L., Rasmussen, S. B., Weber, F., Bowie, A. G., Matikainen, S., and Paludan, S. R. (2005). Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J Virol* 79, 12944-12951.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschoop, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167-1172.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918-1921.
- Myong, S., Cui, S., Cornish, P. V., Kirchhofer, A., Gack, M. U., Jung, J. U., Hopfner, K. P., and Ha, T. (2009). Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science* 323, 1070-1074.
- Nacheva, G. A., and Berzal-Herranz, A. (2003). Preventing undesired RNA-primed RNA extension catalyzed by T7 RNA polymerase. *Eur J Biochem / FEBS* 270, 1458-1465.
- Ortaldo, J. R., Mantovani, A., Hobbs, D., Rubinstein, M., Pestka, S., and Herberman, R. B. (1983). Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 31, 285-289.
- Perrault, J., and Leavitt, R. W. (1978). Inverted complementary terminal sequences in single-stranded RNAs and snap-back RNAs from vesicular stomatitis defective interfering particles. *J Gen Virol* 38, 35-50.
- Pestka, S. (2000). The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers* 55, 254-287.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997-1001.
- Pippig, D. A., Hellmuth, J. C., Cui, S., Kirchhofer, A., Lammens, K., Lammens, A., Schmidt, A., Rothenfusser, S., and Hopfner, K. P. (2009). The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res* 37, 2014-2025.

- Plumet, S., Herschke, F., Bourhis, J. M., Valentin, H., Longhi, S., and Gerlier, D. (2007). Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG-I-mediated interferon response. *PLoS ONE* 2, e279.
- Poeck, H., Besch, R., Maihoefer, C., Renn, M., Tormo, D., Morskaya, S. S., Kirschnek, S., Gaffal, E., Landsberg, J., Hellmuth, J., *et al.* (2008). 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and RIG-I activation against melanoma. *Nat Med* 14, 1256-1263.
- Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O., Finger, K., Roth, S., Rebsamen, M., Hanneschlager, N., Schlee, M., Rothenfusser, S., Barchet, W., *et al.* (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol* 11, 63-69.
- Ranjith-Kumar, C. T., Murali, A., Dong, W., Srisathyanarayanan, D., Vaughan, R., Ortiz-Alacantara, J., Bhardwaj, K., Li, X., Li, P., and Kao, C. C. (2009). Agonist and antagonist recognition by RIG-I, a cytoplasmic innate immunity receptor. *J Biol Chem* 284, 1155-1165.
- Rehwinkel, J., Tan, C. P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E., and Reis e Sousa, C. (2010). RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* 140, 397-408.
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S., and Fitzgerald, K. A. (2005). The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 175, 5260-5268.
- Rozen, F., Pelletier, J., Trachsel, H., and Sonenberg, N. (1989). A lysine substitution in the ATP-binding site of eucaryotic initiation factor 4A abrogates nucleotide-binding activity. *Mol Cell Biol* 9, 4061-4063.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y. M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T., and Gale, M., Jr. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 582-587.
- Saito, T., Owen, D. M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Gale, M. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454, 523-527.
- Samanta, M., Iwakiri, D., Kanda, T., Imaizumi, T., and Takada, K. (2006). EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *Embo J* 25, 4207-4214.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14, 778-809, table of contents.
- Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S., and Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1512-1517.
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C. A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., *et al.* (2009). Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 31, 25-34.
- Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J. C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F. S., Michallet, M. C., Besch, R., Hopfner, K. P., *et al.* (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12067-12072.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., and Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122, 669-682.

- Stetson, D. B., and Medzhitov, R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93-103.
- Strahle, L., Marq, J. B., Brini, A., Hausmann, S., Kolakofsky, D., and Garcin, D. (2007). Activation of the beta interferon promoter by unnatural Sendai virus infection requires RIG-I and is inhibited by viral C proteins. *J Virol* 81, 12227-12237.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., and Gale, M., Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79, 2689-2699.
- Takahasi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Jr., Inagaki, F., and Fujita, T. (2008). Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Molecular cell* 29, 428-440.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2008). MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 20, 17-22.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 227, 75-86.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.
- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., and Kono, D. H. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23, 307-336.
- Uhlenbeck, O. C., Borer, P. N., Dengler, B., and Tinoco, I., Jr. (1973). Stability of RNA hairpin loops: A 6 -C m -U 6. *J Mol Biol* 73, 483-496.
- Vilcek, J. (2003). Novel interferons. *Nat Immunol* 4, 8-9.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* 1, 945-951.
- Wang, Y., Ludwig, J., Schuberth, C., Goldeck, M., Schlee, M., Li, H., Juranek, S., Sheng, G., Micura, R., Tuschl, T., *et al.* (2010). Structural and functional insights into 5'-ppp RNA pattern recognition by the innate immune receptor RIG-I. *Nat Struct Mol Biol* 17, 781-787.
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R., and Paludan, S. R. (2006). Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* 80, 5059-5064.
- Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z., and Shu, H. B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19, 727-740.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., *et al.* (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175, 2851-2858.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5, 730-737.
- Yoneyama, M., Onomoto, K., and Fujita, T. (2008). Cytoplasmic recognition of RNA. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 841-846.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, 591-599.

Zhong, W., Ingravallo, P., Wright-Minogue, J., Skelton, A., Uss, A. S., Chase, R., Yao, N., Lau, J. Y., and Hong, Z. (1999). Nucleoside triphosphatase and RNA helicase activities associated with GB virus B nonstructural protein 3. *Virology* 261, 216-226.

Zuker, M., and Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res* 9, 133-148.



## 7. Verzeichnis der Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
CARD	<i>Caspase activating and recruitment domain</i>
Cardif	<i>CARD adaptor-inducing interferon-beta</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CIAP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
CTD	C-terminale Domäne
DISH	<i>Differentiation induction subtraction hybridization</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang (engl. <i>double-strand</i> )
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
E. coli	Escherichia coli
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMCV	Enzephalomyocarditis-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i>
HeLa	Henrietta Lacks
hi	Hitzeinaktiviert
HO-1	<i>Heme oxygenase-1</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFIH1	<i>Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1</i>
IFN	Interferon

IL	Interleukin
IP-10	<i>Interferon-gamma induced protein 10</i>
IPS-1	<i>IFN-<math>\beta</math> promotor stimulator I</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
IVT	<i>In vitro</i> -Transkription
JEV	<i>Japanese encephalitis-Virus</i>
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
nd	Nicht detektierbar
NDV	<i>Newcastle Disease-Virus</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLR	<i>NOD-like-Rezeptor</i>
NOD	<i>Nucleotide Oligomerization Domain</i>
Nt	Nukleotid
OH	Hydroxylgruppe
p56	Protein 56
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKR	Proteinkinase R
Poly-I:C	Polyinosin-Polycytidin-Säure
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
Rab	<i>Ras-related in brain</i>

---

RD	Regulatorische Domäne
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SeV	Sendaivirus
SF	<i>Superfamily</i>
siRNA	<i>Small-interfering-RNA</i>
ss	Einzelstrang (engl. <i>single-strand</i> )
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
VISA	<i>Virus-induced signaling adapter</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis-Virus</i>
wt	Wildtyp

## 8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Stefan Endres für die Möglichkeit, in der ebenso engagierten wie familiären Atmosphäre seiner Abteilung promovieren zu dürfen. Die Zeit im Labor war für mich nicht nur auf wissenschaftlicher, sondern besonders auch auf menschlicher Ebene ungemein prägend.

Für die ansteckende Begeisterung für wissenschaftliche Fragestellungen, die kontinuierliche Begleitung meiner Doktorarbeit sowie die unvergessliche Zeit sowohl innerhalb, als auch außerhalb des Labors, möchte ich ganz herzlich meinem Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Simon Rothenfusser danken.

Ferner danke ich meinem betreuenden Post-Doc, Dr. Andreas Schmidt, für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie die zahlreichen Ratschläge und Hilfestellungen bezüglich des weiteren Vorgehens. Bei allen Mitdoktoranden möchte ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung bedanken.

Außerdem bedanke ich mich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 1202 – „*Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie*“ der DFG.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Herta und Klaus Hamm, für ihre liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums.

## 9. Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

2009 „5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I.“

Schmidt A\*, Schwerd T\*, **Hamm W\***, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S. (\* authors contributed equally to this work)

*Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jul 21;106(29):12067-72.*

### Abstracts und Poster

2007 „Molecular mechanism of virus recognition by RIG-I-like helicases“

Schwerd T, Hellmuth J, **Hamm W**, Schmidt A, Wenzel M, Hoffmann F, Poeck H, Endres S, Rothenfusser S.

*Oligonucleotide Therapeutics Society, 3rd Annual Meeting, Oktober 2007, Berlin*

2008 „Single-stranded 5'-triphosphate RNA is not sufficient to trigger RIG-I and requires base-paired secondary structures to activate anti-viral signalling“

**Hamm W**, Schwerd T, Hellmuth J, Schmidt A, Poeck H, Cui S, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S.

*Toll2008 Meeting - Recent Advances in Pattern Recognition, September 2008, Lissabon*

### Vorträge

2008 „Molecular patterns of RIG-I ligands“

**Hamm W**

*Third Annual Retreat des Graduiertenkollegs 1202 der DFG, September 2008, Kloster Frauenchiemsee*

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Wolfgang Hamm  
Geburtsdatum 11. Oktober 1983 in Weilheim i. OB

### Schulbildung

1994 – 2003 Staffelsee-Gymnasium Murnau  
2003 Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

2003 – 2004 Heilpädagogische Kindertagesstätte Murnau

### Hochschulbildung

2004 – 2011 Studium der Humanmedizin an der LMU München  
2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2010 – 2011 Praktisches Jahr  
1. Tertial – Anästhesiologie  
Universitätsklinikum der LMU München (Direktor: Prof. Dr. Zwißler)  
2. Tertial – Innere Medizin  
Lehrkrankenhäuser der *Harvard Medical School*, Boston, USA  
3. Tertial – Chirurgie  
*Instituto Universitario del Hospital Italiano*, Buenos Aires, Argentinien  
Hospital Clinico Jose Joaquin Aguirre, *Universidad de Chile*, Santiago de Chile, Chile  
2011 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt

### Promotion

2007-2010 Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Medizinische Klinik Innenstadt, LMU München  
Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres  
Charakterisierung des Liganden des antiviralen Rezeptors Retinoic Acid-Inducible Gene I

**Stipendien**

2007 – 2008	Promotionsstipendium des Graduiertenkollegs 1202 „ <i>Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie</i> “ der DFG
2008 – 2011	Stipendiat des Cusanuswerks
2010	PJ-Stipendium der <i>Harvard-Munich-Alliance for Medical Education</i>

**Beruf**

Seit 2012	Assistenzarzt in der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen, Deutsches Herzzentrum München (Direktor: Prof. Dr. Schömig)
-----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------